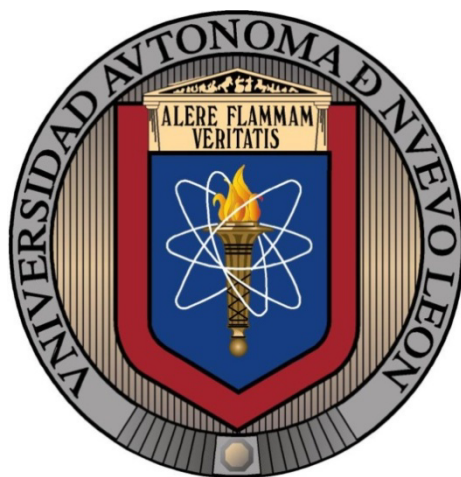


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS Y DETERMINACIÓN DE SU RELACIÓN CLONAL**

POR

SANDRA IVETH MENDOZA IBARRA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

ENERO 2010

**CARACTERIZACIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS Y DETERMINACIÓN DE SU RELACIÓN CLONAL**

Aprobación de la tesis

Dra. Elvira Garza González
Director

Dra. Gloria María González González
Co-director

M.S.P. Jorge Martín Llaca Díaz

Comisión de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS Y DETERMINACIÓN DE SU RELACIÓN CLONAL**

POR

SANDRA IVETH MENDOZA IBARRA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

ENERO 2010

SITIO DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

Director de tesis: Dra. Elvira Garza González

Co-director de tesis: Dra. Gloria María González González

Comisión de tesis: M.S.P. Jorge Martín Llaca Díaz

TABLA DE CONTENIDO

	CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN		
1.0	Bacilos Gram negativos	1
1.1.	Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	1
1.1.1	Características microbiológicas de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	2
1.2	Antibióticos betalactámicos	3
1.2.1	Penicilinas	4
1.2.2	Cefalosporinas	4
1.2.3	Inhibidores de betalactamasas	4
1.2.4	Carbapenémicos	5
1.2.5	Monobactámicos	5
1.2.6	Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos	7
1.3	β -lactamasas	8
1.3.1	Origen de las β -lactamasas	8
1.3.2	Clasificación de las β -lactamasas	9
1.3.3	Historia de las β -lactamasas	12
1.4	β -lactamasas de espectro extendido	12
1.4.1	Tipos de BLEE	13
1.4.1.1	β -lactamasas tipo TEM	13
1.4.1.2	β -lactamasas tipo SHV	14
1.4.1.3	β -lactamasas tipo CTX-M	15

1.4.1.4	Otras BLEE	15
1.4.2	Epidemiología de BLEE	17
1.4.2.1	Prevalencia de BLEE	17
1.4.3	Métodos de detección y caracterización de BLEE	19
1.4.3.1	Métodos de detección de BLEE	19
1.4.3.2	Método de doble difusión de discos	19
1.4.3.3	Método de doble disco	19
1.4.4	Métodos de caracterización de BLEE	20
1.4.4.1	Isoelectroenfoque	20
1.4.4.2	Métodos moleculares	20
1.4.5	Métodos de tipificación de cepas productoras de BLEE	21
2. JUSTIFICACIÓN		22
3. OBJETIVOS		22
3.1	OBJETIVO GENERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. ESTRATEGIA GENERAL		23
5. MATERIALES Y MÉTODOS		24
5.1	Población de de estudio	24

5.2	Identificación de los aislamientos	24
5.3	Fenotipo de resistencia	24
5.3.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	25
5.4	Detección de BLEE por método de doble disco	25
5.5	5.5 Caracterización de cepas BLEE	25
5.5.1	Extracción de DNA bacteriano	25
5.5.2	Amplificación del DNA bacteriano por PCR	26
5.5.3	Electroforesis en gel de agarosa	27
5.5.4	Secuenciación de productos amplificados	27
5.6	Relación clonal de los aislamientos productores de BLEE	28
5.6.1	Preparación del DNA bacteriano	28
5.6.2	Restricción	28
5.6.3	Electroforesis en gel de campos pulsados	29
5.7	Análisis de datos	29
6.	RESULTADOS	30
6.1	Características de los aislamientos clínicos de estudio	30
6.2	Resultados de fenotipo de resistencia	32
6.3	Aislamientos productores de BLEE	37
6.3.1	Características de los aislamientos productores de BLEE	37
6.3.2	Distribución de los aislamientos productores de BLEE por edad	37
6.3.3	Distribución de los aislamientos productores de BLEE por especímenes	38

6.3.4	Distribución de los aislamientos productores de BLEE por procedencia	39
6.3.5	Fenotipo de resistencia de las especies productoras de BLEE	40
6.4	Caracterización de tipo y familia de BLEE en las cepas productoras	40
6.5	Relación clonal de las cepas productoras de BLEE	42
6.5.1	Aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de BLEE	42
6.5.2	Aislamientos de <i>E. cloacae</i> productores de BLEE	44
6.5.3	Aislamientos de <i>E. coli</i> productores de BLEE	45
6.5.4	Aislamientos de <i>S. marcescens</i> productores de BLEE	46
7. DISCUSIÓN		48
8. CONCLUSIONES		54
9. REFERENCIAS		55
10. APÉNDICES		60
A	Preparación de reactivos y soluciones	60

LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Antibióticos betalactámicos	3
Tabla 2. Clasificación de β -lactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros	9
Tabla 3. Otras BLEE	16
Tabla 4. Componentes de PCR	26
Tabla 5. Secuencia de primers	26
Tabla 6. Condiciones de PCR	27
Tabla 7. Mezcla de reacción de enzima	29
Tabla 8. Características de la población estudiada	30
Tabla 9. Resultados de fenotipo de resistencia de <i>E. cloacae</i>	32
Tabla 10. Resultados de fenotipo de resistencia de <i>E. coli</i>	33
Tabla 11. Resultados de fenotipo de resistencia de <i>S. marcescens</i>	34
Tabla 12. Resultados de fenotipo de resistencia de <i>K. pneumoniae</i>	34
Tabla 13. Resultados de fenotipo de resistencia de <i>A. baumannii</i>	36
Tabla 14. Resultados de fenotipo de resistencia de <i>P. aeruginosa</i>	36
Tabla 15. Resultados de especies productoras de BLEE	37
Tabla 16. Resultados del tipo de BLEE en las cepas productoras	41

Tabla 17.	Características de las clonas de <i>E. coli</i> .	46
Tabla 18.	Características de las clonas de <i>S. marcescens</i> .	47

LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁGINA</i>
Figura 1. Estructura de los antibióticos betalactámicos	6
Figura 2. Clasificación de β -lactamasas de Ambler	11
Figura 3. Sustituciones de aminoácidos en secuencia de TEM	14
Figura 4. Sustituciones de aminoácidos en secuencia de SHV	15
Figura 5. Estrategia general	23
Figura 6. Distribución de aislamientos clínicos por espécimen	31
Figura 7. Distribución de aislamientos clínicos por procedencia	32
Figura 8. Distribución de los aislamientos productores de BLEE por edad	38
Figura 9. Distribución de los aislamientos productores de BLEE por especímenes	38
Figura 10. Distribución de los aislamientos productores de BLEE por procedencia	39
Figura 11. Fenotipo de resistencia de las especies productoras de BLEE	40
Figura 12. Análisis de la relación clonal de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de BLEE	42
Figura 13. Análisis de clona A y A1 productoras de SHV-12 de <i>K. pneumoniae</i> en función del tiempo	43
Figura 14. Análisis de clona A productora de TEM-1 de <i>K. pneumoniae</i> en función del tiempo	43
Figura 15. Análisis de la relación clonal de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i>	44

productores de BLEE

Figura 16.	Análisis de clonas de <i>E. cloacae</i> productoras de SHV-5/CTX-M-15 y TEM-1 en función del tiempo	45
Figura 17.	Análisis de la relación clonal de los aislamientos de <i>E. coli</i> productores de BLEE	46
Figura 18.	Análisis de la relación clonal de los aislamientos de <i>S. marcescens</i> productores de BLEE	47

NOMENCLATURA

AC	Ácido clavulánico
AK	Amikacina
AM	Ampicilina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
BHI	Cerebro infusión corazón
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
C	Cromosómico
CAZ	Ceftazidima
CG	Cirugía General
CLSI	Instituto de <i>Estándares Clínicos y de Laboratorio</i>
CRO	<i>Ceftriaxona</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTP's	Deoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Etilendiaminotetracetato
FEP	Cefoperazona
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
h	Hora
Hys	Histidina
IEF	Isoelectroenfoque
lb	Libras
LCR	Reacción en cadena de ligasa
Leu	Leucina
LVX	Levofloxacina
Lys	Lisina
MER	Meropenem
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MI	Medicina Interna

NOMENCLATURA

min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimoles
NEURO	Neurocirugía
nm	Nanómetros
P	Plasmídico
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas fijadoras de penicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados

Phe	Fenilalanina
pI	Punto isoeléctrico
PIP	Piperacilina
pM	Picomoles
PREE	Preescolares
Pro	Prolina
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
RSI	Restricción en sitio de inserción
s	Segundos
Ser	Serina
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Thr	Treonina
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UCIA	Unidad de Cuidados Intensivos Adultos
UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatos
UCIPQ	Unidad de Cuidados Intensivos Postquirúrgicos
UFC	Unidades formadoras de colonias

NOMENCLATURA

UV	Ultravioleta
V	

RESUMEN

Sandra Iveth Mendoza Ibarra

Fecha de graduación: Enero 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas y determinación de su relación clonal

Número de páginas: 57

Como requisito parcial para obtener el Título de Maestro en Ciencias con orientación terminal en Microbiología Médica

Área de estudio: Microbiología Médica

Propósito y Método del Estudio: El propósito fue realizar la caracterización de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y determinar si existía relación clonal entre ellas. Se incluyeron 520 aislamientos clínicos de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. Se les realizó el fenotipo de resistencia, se determinó si producían BLEE, posteriormente a las especies productoras, se realizó la caracterización de los genes que codifican para TEM, SHV y CTX-M por PCR y secuenciación. Por último se compararon los patrones de PFGE para determinar la relación clonal entre las especies productoras de BLEE.

Contribuciones y conclusiones: El principal mecanismo de resistencia frente a los antibióticos betalactámicos es la producción de enzimas betalactamasas, es importante conocer el tipo de éstas y la relación clonal de este tipo de aislamientos para poder diseñar medidas de estrategia en el control y diseminación de estos, en este estudio se encontraron tipos de BLEE reportados previamente a nivel mundial, pero es el primer reporte en México de SHV-12 y CTX-M-15 en *K. pneumoniae*, *E. cloacae* productora de SHV-2, TEM-1/CTX-M-15, *E. coli* productora de SHV-2 y *S. marcescens* productora de SHV-2 y SHV-12. Los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* fueron los que presentaron mayor relación clonal.

Dra. Elvira Garza González

Director de Tesis

Dra. Gloria María González González

Co-director de Tesis

M.S.P. Jorge Martín Llaca Díaz

Comisión de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Bacilos Gram negativos

1.1 Familia *Enterobacteriaceae*

Los bacilos Gram negativos forman parte de uno de los grupos de bacterias de importancia clínica más grande y heterogéneo de importancia médica, en él se encuentran los géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. En esta familia se han descrito 40 géneros con más de 150 especies. Estos géneros se han clasificado según sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación y secuenciación de los ácidos nucleicos. A pesar de la complejidad de esta familia, menos de 20 especies son las responsables de más del 95% de las infecciones.

Las Enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran distribuidos en el suelo, el agua, la vegetación y también en la flora intestinal normal de muchos animales, incluido el ser humano.

Producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, como el 30% al 35% de las septicemias, más del 70% de las infecciones del aparato urinario y muchas infecciones intestinales.

Las especies más frecuentemente aisladas con significado clínico son:

Citrobacter freundii, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella entérica*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*.

1. 1.1 Características microbiológicas de la familia *Enterobacteriaceae*

El tamaño de este grupo de especies oscila entre 2-3 μm por 0.4-0.6 μm , no forman esporas, pueden ser móviles o inmóviles. Estos organismos crecen bien en medios artificiales simples, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Son catalasa positiva, oxidasa negativa, reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa por la vía ácido mixta o del butanodiol. Degradan también a un amplio conjunto de otros carbohidratos y las diferencias metabólicas han servido para establecer la identificación de las especies.

Se han identificado numerosos factores de virulencia en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Algunos son comunes a todos los géneros, mientras que otros son específicos de las cepas virulentas, entre estos están: endotoxina, formación de cápsula, variación de fase antigénica, sistemas de secreción de tipo III, secuestro de factores de crecimiento, resistencia al efecto bactericida del suelo y resistencia a los antibióticos, esta resistencia puede estar codificada en plásmidos transferibles e intercambiarse entre especies, géneros e incluso familias de bacterias.

1.2 Bacilos Gram negativos no fermentadores

Los bacilos no fermentadores son el segundo grupo más grande de bacilos Gram negativos, forman un conjunto de patógenos oportunistas de plantas, animales y el ser humano. A pesar de los muchos géneros existentes, sólo unos pocos se aíslan con frecuencia. En concreto, más del 75% de las bacterias no fermentativas aisladas a partir de muestras clínicas corresponden a las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Moraxella catarrhalis*.

1.2.1 Características microbiológicas de bacilos Gram negativos no fermentadores

Este grupo, está formado por bacilos móviles, aerobios, morfológicamente similares a las Enterobacterias, pero se diferencian de éstas en que no fermentan la glucosa y la mayoría son oxidasa positivos.

Para comprender los mecanismos de resistencia de las bacterias a un antibiótico, se debe conocer la naturaleza de los antibióticos y su mecanismo de acción. Un antibiótico es un compuesto que destruye una bacteria o inhibe su crecimiento.

2. Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos forman la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica, poseen eficacia terapéutica y no son tóxicos, ya que actúan bloqueando las enzimas biosintéticas, inhibiendo el peptidoglicano que forma parte de la pared celular bacteriana. La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas (Tabla 1).

Tabla 1. Antibióticos betalactámicos

Penicilinas	Penicilina Amoxicilina Ticarcilina Piperacilina Carbencilina
Cefalosporinas	1ª generación: Cefalotina, Cefazolina, Cefalexina 2ª generación: Cefaclor, Cefuroxima 3ª generación: Cefoperazona, Cefotaxima, Ceftazidima 4ª generación: Cefepima, Cefpiroma
Monobactámicos	Aztreonam
Carbapenémicos	Imipenem Meropenem

2.1 Penicilinas

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades.

2.2 Cefalosporinas

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrothiacínico, en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas y un anillo betalactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas.

2.3 Inhibidores de β -lactamasas

Actualmente se emplean en clínica inhibidores de las β -lactamasas de estructura química betalactámica. El ácido clavulánico tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno, que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona una afinidad mayor por las β -lactamasas, y la falta de la cadena lateral acilamino en posición 6. El sulbactam es una sulfona semisintética del ácido penicilánico. El tazobactam se diferencia del sulbactam por la presencia de un grupo triazol en posición 3.

2.4 Carbapenémicos

La estructura básica de los carbapenémicos consiste en un anillo betalactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condicionan la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las β -lactamasas, siendo los betalactámicos de más amplio espectro y actividad.

2.5 Monobactámicos

Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario (Gudiol, 2003). Figura 1 (Marín, 2003).

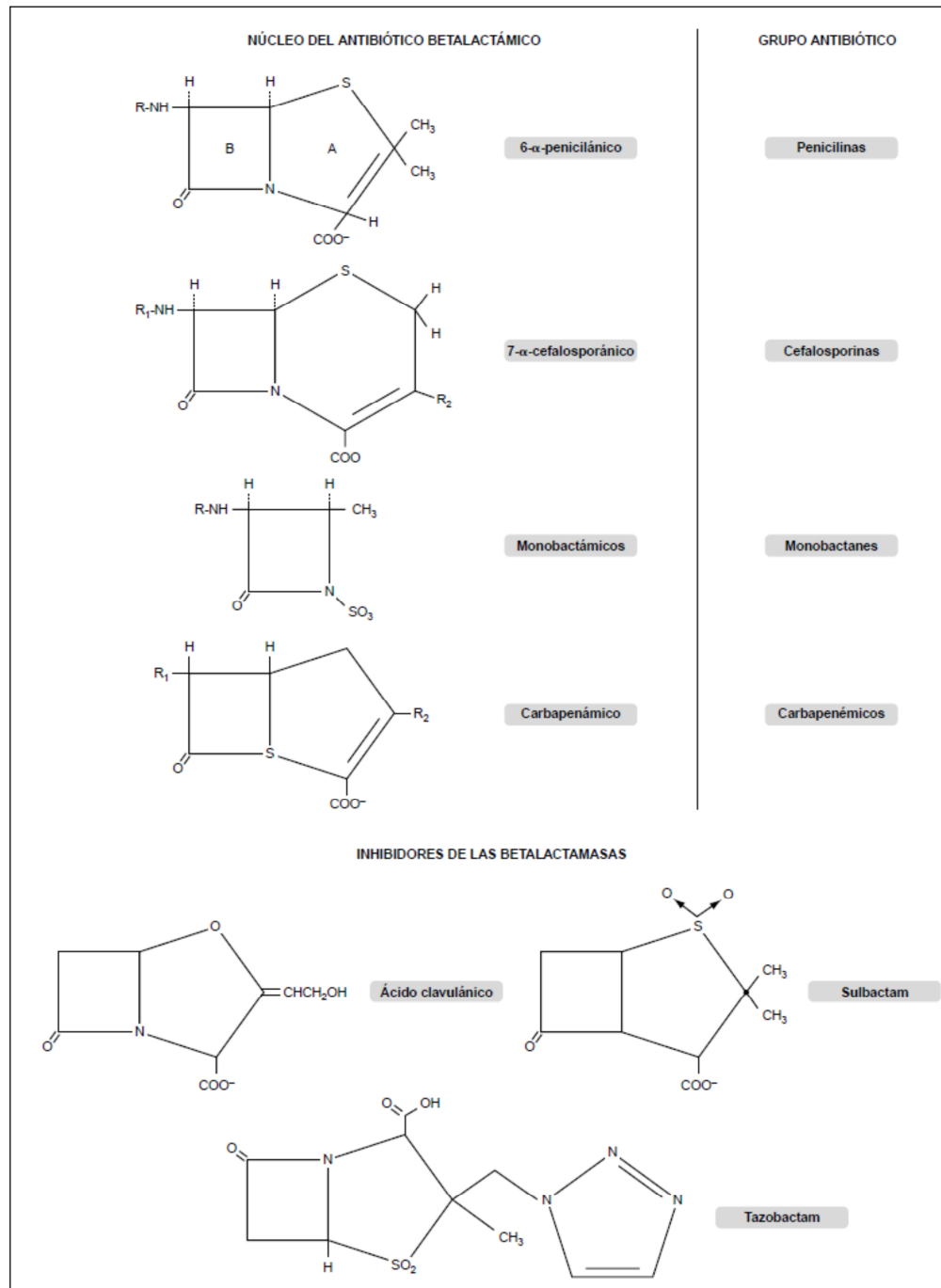


Figura 1. Estructura de los antibióticos betalactámicos

2.6 Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública mundial con consecuencias graves de morbi-mortalidad en los hospitales y con pérdidas económicas para las instituciones de salud.

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se asocian. El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias.

Los mecanismos implicados son los siguientes:

1. Alteraciones de la permeabilidad. La presencia de membrana externa en los bacilos Gram negativos dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas, como los betalactámicos, que necesitan utilizar los poros proteicos (porinas) para tal fin. La resistencia es secundaria a alteraciones en dichas porinas.
2. Modificación de las dianas. Los betalactámicos deben unirse a las PBP para ejercer su efecto bactericida. Cambios a nivel de las PBP implican una pérdida de afinidad de los betalactámicos por ellas, con la consiguiente disminución de su actividad. Este mecanismo afecta fundamentalmente a cocos Gram positivos.
3. Expresión de bombas de eliminación activa. Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de flujo, dependientes de energía, que bombean al antimicrobiano al exterior. Este mecanismo se ha demostrado en ciertos bacilos Gram negativos, especialmente en *P. aeruginosa*.
4. Producción de enzimas. Actualmente constituye el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos, sobre todo en las bacterias Gram negativas.

3. β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen cromosómico o transferido por plásmidos o transposones. Actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que éste pierde la capacidad de unirse a las PBP. El grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes betalactámicos y propiedades hidrolíticas. La producción de β -lactamasas puede ser constitutiva (se producen siempre) o inducible (sólo en presencia de un betalactámico). En este sentido no todos los betalactámicos tienen el mismo poder de inducción, pudiendo ser desde poco a altamente inductores. En los microorganismos Gram negativos, las β -lactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que en los estafilococos suelen ser inducibles. Las β -lactamasas cromosómicas, que son producidas fundamentalmente por bacterias Gram negativas, pueden ser constitutivas o inducibles (Gudiol, 2003).

3.1 Origen de las β -lactamasas

Las β -lactamasas, probablemente derivan de diferentes PBP, con las que guardan homología secuencial y estructural. Es posible que su función natural originaria fuera participar en la biosíntesis de la pared o la de evitar la autolesión en los microorganismos que producen naturalmente antibióticos betalactámicos (Livermore, D. 1995, Livermore, D. 1998).

El primer reporte de una enzima β -lactamasa fue realizado en Nature en 1940 (E. P. Abraham 1940).

Luego de la introducción de penicilinas sintéticas y cefalosporinas de 1ª generación a partir de 1960, se describe en 1965 la primera β -lactamasa codificada por plásmidos,

encontrada en un aislamiento de *E. coli*, procedente de un hemocultivo, de una paciente griega llamada “Temoniera”, de ahí su nombre TEM (Datta N. 1965).

Otra β -lactamasa es SHV-1, denominada así por su estructura “sulfhidrilo variable” esta enzima es comúnmente encontrada en *K. pneumoniae*, pero es usualmente de origen plasmídico en *E. coli*.

Después de la introducción a partir de 1978 de cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, se describe en 1983 una β -lactamasa plasmidica con un perfil de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación y sensibles a cefoxitina en Alemania. (Knothe, 1983). El análisis de estas cepas demostró posteriormente que la resistencia era debida a la producción de una β -lactamasa plasmídica transferible derivada de SHV-1 y denominada SHV-2 (Kliebe 1985).

El incremento de hidrólisis de estas enzimas frente a antibióticos betalactámicos hizo que se les denominara β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) (Philippon 1989).

3.2 Clasificación de las β -lactamasas

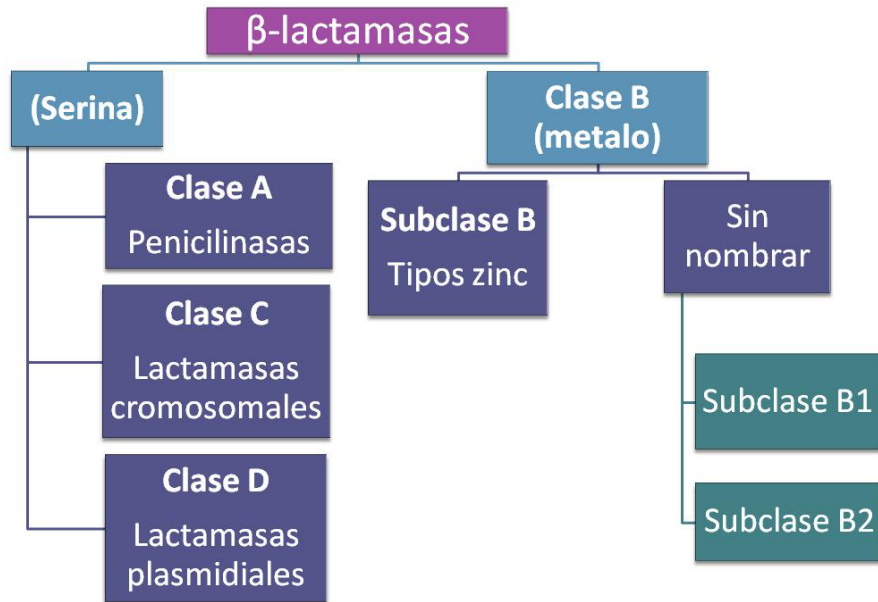
Inicialmente las β -lactamasas fueron designadas por el nombre de la cepa o plásmido que las producía. Posteriormente la caracterización por punto isoeléctrico además del carácter inducible o constitutivo de la expresión y el fenotipo de resistencia se emplearon para clasificar a los diferentes tipos de β -lactamasas reportadas.

En 1980 Ambler clasificó a estas enzimas en base a su secuencia de aminoácidos y centro activo en cuatro clases: A, B, C y D. Las enzimas de la clase A, C y D poseen serina en su centro activo, que reacciona con el anillo betalactámico, abriéndolo irreversiblemente e inactivando el antibiótico; mientras que las enzimas de clase B poseen Zinc en su centro activo (metalo β -lactamasas), que reacciona con el grupo carbonil del enlace amida del betalactámico inactivándolo (Samaha-Kfuory y Araj, 2003). Figura 2

Tabla 2. Clasificación de β -lactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros

C: Cromosómico

P: Plasmídico



Grupo	Clase	Sustrato preferente	Inhibición AC	Inhibición EDTA	Gen	Enzimas representativas	Microorganismo
1	C	Cefalosporinasas	-	-	C P	AmpC MIR-1, MOX-1, FOX-1	Enterobacterias
2a	A	Penicilinas	+	-	C P	<i>S. aureus</i> (A, B, C, D)	<i>S. aureus</i>
2b	A	Penicilinas Cefalosporinas 1ª generación	+	-	P	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Enterobacterias <i>H. influenzae</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>P. aeruginosa</i>
2be	A	Penicilinas Cefalosporinas 1ª a 3ª generación Monobactámicos	+	-	P C	TEM-3 a 29, 43, 44, 50, 51, 52 SHV-2 a 10, 12 SHV-1	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas Inhibidores de β-lactamasas	+/-	-	P	TEM-30 a 42, 45	Enterobacterias
2c	A	Penicilinas Carbenicilina	+	-	P	PSE-1, 3, 4	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2d	D	Penicilinas Cloxacilina	+/-	-	P	OXA-1 a 10	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2de	D	Penicilinas Cloxacilina Cefalosporinas 1ª a 3ª generación	+/-	-	P	OXA-11 a 21	<i>P. aeruginosa</i>
2e	A	Cefalosporinas 1ª a 3ª generación	+	-	C	Cefuroximasas	<i>P. vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas Cefalosporinas 1ª a 3ª generación Carbapenémicos	+	-	C	NMC-A Sme-I IMI-I	<i>E. cloacae</i> <i>S. marcescens</i>
3	B	Penicilinas Cefalosporinas 1ª a 3ª generación Carbapenémicos			C C/P P	L-1 CcrA IMP-1	<i>S. maltophilia</i> <i>B. fragilis</i> Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
4		Penicilinas	-	¿	C P	ND SAR-2	<i>B. cepacia</i> <i>E. coli</i>

Figura 2. Clasificación de β -lactamasas de Ambler

En 1995 Bush, Jacoby y Medeiros unifican los criterios de clasificaciones anteriores y agrupan las enzimas en base a los sustratos hidrolizados y a sus perfiles de inhibición, en esta se describen cuatro grupos en el 1: clasifica a las cefalosporinas inhibidas por aztreonam, en el grupo 2 a las penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas inhibidas por ácido clavulánico, el grupo 3 describe las metalo β -lactamasas inhibidas por EDTA y en el grupo 4 se encuentran las enzimas que no presentan inhibición por estos compuestos. Tabla 2.

4. β -lactamasas de espectro extendido

Las BLEE tienen la capacidad de hidrolizar y causar resistencia a algunas cefalosporinas de 3ª generación como cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima y monobactámicos como aztreonam, no así para cefamicinas como cefoxitina y cefotetan, ni para imipenem, meropenem y ertapenem (Pitout J. D., Laupland K. B. 2008).

La mayor parte de estas enzimas pertenecen a la clase A de Ambler y al grupo 2, 2b y 2be de Bush, Jacoby y Medeiros y presentan inhibición por ácido clavulánico.

4.1 Tipos de BLEE

Las enzimas BLEE se originan a partir de las β -lactamasas clásicas como TEM-1 y SHV-1, por medio de mutaciones concretas en los genes que las codifican, las cuales originan cambios en la secuencia de aminoácidos, dando lugar a diferentes variantes.

La acumulación de nuevas mutaciones puede incrementar y modificar el espectro de la enzima y variar el grado de actividad sobre los antibióticos betalactámicos.

4.1.1 β -lactamasas tipo TEM

La expresión de TEM-1 es el mecanismo más común de resistencia a los antibióticos betalactámicos entre las bacterias Gram negativas. Arriba del 90% de la resistencia a ampicilina a *E. coli* es debida a su producción.

La enzima TEM-2 presenta una única sustitución de aminoácidos, la de glutamina por lisina en la posición 39. Esto genera un cambio del punto isoeléctrico de 5.4 a 5.6, pero no se modifica el perfil del sustrato.

Las sustituciones en los aminoácidos que ocurren en la secuencia de TEM se producen en un número limitado de posiciones. La combinación de estos cambios produce la aparición de los fenotipos BLEE. Por ejemplo, la sustitución de arginina por serina en la posición 164 produce en TEM-12 CMI más elevado para ceftazidima que para cefotaxima.

Actualmente se han descrito más de 170 tipos de TEM (Figura 3) en especies de la familia *Enterobacteriaceae*, además de otras bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* (Bradford P. A. 2001).

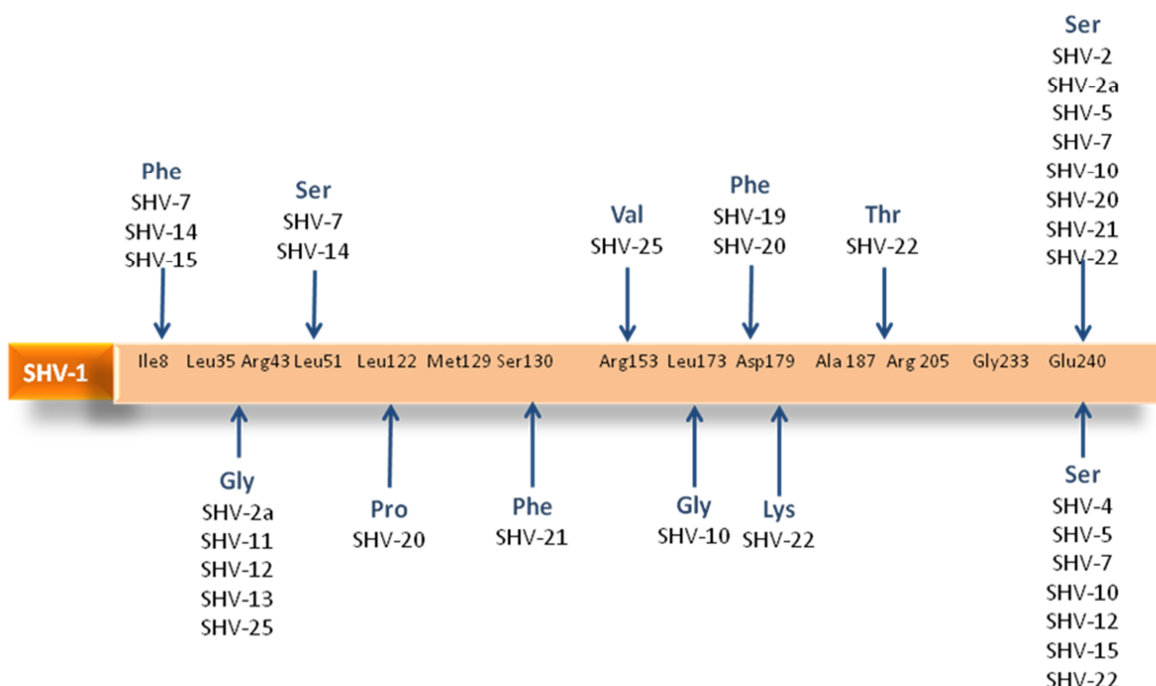


Figura 4. Sustituciones de aminoácidos en secuencia de SHV

4.1.3 β -lactamasas tipo CTX-M

Durante los últimos 5 años las enzimas tipo CTX-M han sido las más descritas, particularmente en Europa y Sudamérica. Hasta el momento, se han reportado más de 90 variantes, los cuales se dividen en 5 grupos con base en sus secuencias de aminoácidos: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 y CTX-M25. Poseen una secuencia de aminoácidos distinta a TEM o SHV.

Inicialmente se aislaron de *Kluyvera spp.*, usualmente presentan actividad hidrolítica contra cefotaxima y están asociadas con elementos de transposición (Pitout J. D., Laupland K. B. 2008).

4.1.4 Otras BLEE

Existen otras BLEE, como OXA, ésta tiene la característica de conferir resistencia a oxacilina y cloxacilina y son pobremente inhibidas por ácido clavulánico. Han sido

descritas principalmente en *P. aeruginosa*. En la tabla 3 se muestran otros tipos de BLEE y sus características.

Tabla 3. Otras BLEE

BLEE	País de origen	Especies bacterianas
BES-1	Brasil	<i>S. marcescens</i>
FEC-1	Japón	<i>E. coli</i>
GES-1	Guinea Francesa	<i>K. pneumoniae</i>
OXA-1	Turquía, Francia	<i>P. aeruginosa</i>
PER-1	Francia	<i>P. aeruginosa</i>
PER-2	Argentina	<i>S. enterica</i>
SFO-1	Japón	<i>E. cloacae</i>
TLA-1	México	<i>E. coli</i>
Toho-1 y 2	Japón	<i>E. coli</i>
VEB-1	Vietnam/Tailandia	<i>E. coli</i>

4.2 Epidemiología de BLEE

Las infecciones nosocomiales producidas por microorganismos productores de BLEE constituyen actualmente uno de los principales problemas sanitarios, y son de gran importancia clínica y epidemiológica.

El principal mecanismo de transmisión de estos microorganismos ocurre a través de las manos del personal sanitario, que se coloniza cuando entran en contacto con pacientes que, a su vez, están colonizados. El aparato digestivo es el principal reservorio de estas cepas. La tasa de portadores fecales en situaciones de endemia en unidades de cuidados intensivos puede llegar al 30-70% de los pacientes ingresados. Se han descrito otros mecanismos de transmisión que han involucrado a los objetos que rodean a los pacientes o a productos utilizados en la higiene de los mismos, pero la contribución real de estas fuentes en el desarrollo del brote es difícil de determinar. Los pacientes con mayor riesgo de desarrollar colonización o infección por microorganismos productores de BLEE son aquellos que tienen una enfermedad de base grave, estancias prolongadas en el hospital, diferentes objetos médicos de soporte vital (sonda urinaria, catéteres intravasculares, tubos endotraqueales) y reciben tratamiento antimicrobiano durante períodos prolongados (Eliecer Canoa y col. 2008).

4.2.1 Prevalencia de BLEE

A pesar de que la producción de BLEE se describió inicialmente en Europa en 1983, inmediatamente después se identificaron en Estados Unidos de Norteamérica y a partir de entonces se han identificado prácticamente en todo el mundo. Microorganismos productores de BLEE han sido encontrados principalmente en *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* y *E. coli* entre otras, asociadas a brotes nosocomiales en grandes hospitales particularmente en las áreas de cuidados intensivos y quirúrgicas, pero recientemente también se han identificado como causales de brotes en unidades de cuidados para pacientes crónicos o asilos de ancianos. En Europa la BLEE identificada con mayor

frecuencia ha sido del tipo SHV-5 mientras que en los EUA TEM-10 y TEM-12 son las más prevalentes. En América Latina existe escasa información pero estudios principalmente de Argentina, Venezuela, Brasil y México reportan SHV-5 y CTX-M-2 como las más prevalentes. En México, Silva y col. han sido los pioneros en el análisis de este tipo de resistencia bacteriana y han descrito que en un análisis de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter spp* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación predominan BLEE de tipo SHV particularmente SHV-5 y adicionalmente describieron una nueva BLEE denominada TLA-1 (Silva J. y col. 2000) descrita en México (Alpuche y col. 2002).

En México existen algunos reportes que documentan este tipo de aislamientos y que causan altos índices de morbi-mortalidad. Entre éstos destacan el brote producido por *K. pneumoniae* en un hospital de Cuernavaca, Morelos que incluyó 21 niños menores de 2 meses durante un periodo de 4 meses (junio-octubre 1996), la tasa de mortalidad fue del 62% (13 de 21 niños). Este brote fue causado por una sola clona de *K. pneumoniae* determinada por electroforesis en gel de campos pulsados y que fue susceptible únicamente a ciprofloxacina, imipenem y cefoxitin. Un segundo brote producido por *K. pneumoniae* en un hospital pediátrico de la ciudad de México, en este caso la diseminación de la resistencia fue debido a una clona mayoritaria de este microorganismo y a la transferencia horizontal de un plásmido que contenía al gen productor de la enzima SHV-5. Un tercer brote reportado por el grupo de la Dra. Celia Alpuche, ocurrido en un hospital de la Secretaría de Salud de Durango, el cual incluyó casi tres años de vigilancia epidemiológica con 82 aislamientos clínicos, en este periodo se identificaron dos clonas mayoritarias en los servicios de pediatría y en la unidad de cuidados intensivos neonatal, la diseminación de la resistencia a cefalosporinas también fue identificada por dos BLEE (SHV-5 y TLA-1) cuyos genes estaban contenidos en un mismo plásmido (Silva-Sánchez J. y col. 2006).

4.3 Métodos de detección y caracterización de BLEE

4.3.1 Métodos de detección de BLEE

Existen diferentes técnicas mediante las cuales se puede determinar la producción de BLEE, basados en la capacidad del ácido clavulánico para incrementar la actividad de una cefalosporina de 3ª generación, debido al efecto inhibitorio que este compuesto ejerce sobre las enzimas.

4.3.2 Método de doble difusión de discos

Uno de los métodos más difundidos en los laboratorios clínicos es el de doble difusión de discos. Consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros con ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y aztreonam (30 µg). La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE.

4.3.3 Método de doble disco

En la actualidad existen sistemas comerciales que añaden inhibidores de β -lactamasas, esencialmente ácido clavulánico, a las cefalosporinas de amplio espectro, cefotaxima, ceftazidima y cefepima. Por ejemplo, debe destacarse los discos con ácido clavulánico [ceftazidima-clavulánico (30-1 µg), cefotaxima-clavulánico (30-1 µg) y cefepima-clavulánico (30-1 µg)], y las tiras de E-test, que contienen en una parte de ellas concentraciones decrecientes de la cefalosporina y en la otra la misma cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico (2 µg) por cada concentración. En todos los casos es recomendable utilizar simultáneamente los discos o las tiras de ceftazidima y cefotaxima en asociación con el ácido clavulánico ya que no todas las enzimas hidrolizan por igual estos dos substratos, y con la utilización exclusiva de uno de ellos podría limitarse su detección.

4.4 Métodos de caracterización de BLEE

4.4.1 Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) permite conocer el punto isoelectrico (pI) de la proteína y era de gran utilidad cuando existían pocas BLEE descritas. En la actualidad, se utiliza poco debido a la descripción de diferentes BLEE que comparten idéntico pI (<http://www.lahey.org/Studies>). Sin embargo, es muy útil si se combina con el análisis del fenotipo de sensibilidad ya que puede orientar el tipo de BLEE para un análisis posterior del perfil de substrato o estudio molecular. Las BLEE de tipo TEM descritas hasta el momento tienen valores de pI que oscilan entre 5,2 y 6,5, las de tipo SHV entre 7,0 y 8,2 y las CTX-M entre 7,6 y 9,0.

4.4.2 Métodos moleculares

Las técnicas de amplificación son las exitosas, debido a su fácil realización, permiten la secuenciación posterior del producto de PCR, siendo muy útiles para la caracterización del enzima. El uso de primers específicos diseñados para detectar mutaciones puntuales y el desarrollo de la reacción de amplificación en condiciones estrictas permite la caracterización de algunas de las BLEE.

Como alternativa a la secuenciación posterior del producto de PCR se han diseñado diferentes variantes de la técnica de PCR que pueden orientar sobre el tipo de BLEE. Se ha introducido la PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis*) o análisis de los perfiles de restricción con diferentes enzimas del producto de PCR (utilizado esencialmente con la familia SHV), la técnica RSI-PCR (*restriction site insertion*) o amplificación con primers que crean lugares de restricción próximos al extremo 3' o la técnica PCR-SSCP (*single-strand conformation polymorphisms*) en la que una vez amplificado el producto de PCR se somete a restricción con endonucleasas, apertura de las hebras de DNA y electroforesis de los fragmentos generados. También se ha propuesto la LCR (*ligase chain reaction*) para la caracterización de las BLEE de tipo SHV. Más

recientemente se ha propuesto la utilización de la PCR en tiempo real para la detección y caracterización de las BLEE de tipo SHV. En esta técnica se utilizan sondas marcadas con diferentes fluorocromos según el tipo de mutación. Dada el alto número de mutaciones descritas, ninguna de estas técnicas asegura la caracterización final del enzima por lo que la secuenciación del fragmento de PCR continúa siendo el método de referencia (Zemelman y col. 2002).

4.5 Métodos de tipificación de cepas productoras de BLEE

En estas aplicaciones el objetivo de los marcadores moleculares es el de definir la relación existente, clonal o no, entre los aislamientos estudiados. El término clon o grupo clonal en epidemiología hace referencia al grupo de aislamientos relacionados por el hecho de descender de un ancestro común, esto es, por formar parte de una cadena de replicación y transmisión. Las cepas relacionadas provienen de la expansión clonal de un precursor único y poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y fenotipos significativamente superior al que se encontraría entre aislamientos no relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente.

Merece también especial mención, la diseminación horizontal entre bacterias (del mismo o distinto taxón) de plásmidos o elementos genéticos potencialmente móviles (transposones, integrones, fagos) que contengan secuencias relevantes epidemiológicamente, como por ejemplo, genes de resistencia antibiótica o de virulencia.

La aplicación de técnicas y marcadores de epidemiología molecular es indispensable en el estudio de la infección nosocomial, sobre todo en hospitales en los que se dispone de unidades de cuidados intensivos, neonatología, quemados, hematología u oncología, en donde ingresan pacientes susceptibles de adquirir infecciones intrahospitalarias, en este caso cepas productoras de BLEE.

La macrorrestricción de ADN cromosómico, incluye la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), siendo una de las más utilizadas ya que presenta gran versatilidad y permite conocer la clonalidad de diferentes aislados en situaciones epidémicas con tiempo y espacio definido (Pere y col. 2005).

CAPÍTULO 2.

JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por bacterias productoras de BLEE son un problema de salud importante a nivel mundial.

Para apoyar las estrategias en el control, vigilancia y tratamiento de estas infecciones es indispensable conocer el tipo de BLEE, su distribución y posible diseminación clonal.

CAPÍTULO 3.

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las β -lactamasas de espectro extendido en bacterias Gram negativas y determinar su relación clonal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Seleccionar aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas.
2. Analizar el fenotipo de resistencia a diversos antibióticos de los aislamientos clínicos.
3. Determinar la producción de BLEE en los aislamientos clínicos.
4. Caracterizar el tipo y familia de BLEE en las cepas productoras.
5. Evaluar la relación clonal de las cepas productoras de BLEE.

CAPÍTULO 4.
ESTRATEGIA GENERAL

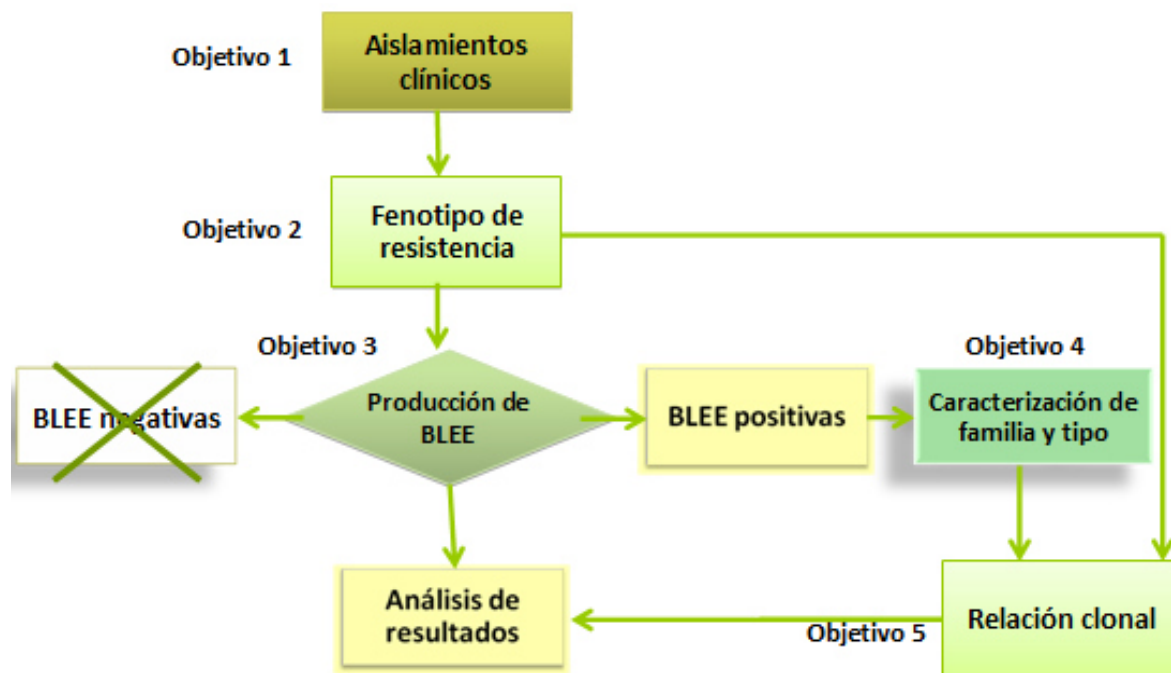


Figura 5. Estrategia general

CAPÍTULO 5.

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Población de de estudio

Se incluyeron aislamientos clínicos de *A. baumannii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. marcescens*

Utilizando los siguientes criterios:

Inclusión: Obtenidas de pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, del período Enero 2006 - Junio 2009.

Exclusión: Aislamientos del mismo paciente.

5.2 Identificación de los aislamientos

A partir de los aislamientos obtenidos, se realizaron las pruebas bioquímicas primarias (oxidasa y crecimiento en agar EMB y McConkey). Se utilizó el sistema API (BioMérieux Durham, E.E.U.U.). Anexo 1. La lectura del sistema se realizó mediante el software API (BioMérieux Durham, E.E.U.U.).

5.3 Fenotipo de resistencia

Se utilizó el método de microdilución en placa, de acuerdo a la norma establecida por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2009 M02-07. En placas de fondo U de 96 pozos, se hicieron diluciones de antibióticos en la concentración mostrada de acuerdo a la tabla.

Se preparó una suspensión de la bacteria en solución salina estéril, se tomaron de 2 a 3 colonias de la placa petri con un hisopo y se suspendió en la solución. Se ajustó la turbidez de 0.08 a 0.1 de absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, California, E. E. U. U.) Luego de preparar el inóculo de la suspensión bacteriana se

añadieron 100 µL a la placa con antibióticos. Se dejó incubar por 20-24 h y se procedió a realizar la lectura.

5.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI es la mínima concentración de antibiótico expresado en µg/mL que inhibe el crecimiento del microorganismo.

5.4 Detección de BLEE por método de doble disco

Se tomaron 10 µL de una suspensión 0.5 de Mc Farland y se colocaron en 11 mL de caldo Mueller-Hinton para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL.

La suspensión se inoculó con hisopo en una placa petri de Mueller-Hinton. Se colocaron 2 discos de cefotaxima y 2 de cefatzidima, a 2 de ellos se les añadieron 10 µL de una solución de ácido clavulánico 1 mg/mL y se incubó 24 horas a 37°C. La interpretación se realizó de la siguiente manera: Un halo de inhibición de 5 mm o más en los discos con ácido clavulánico, se consideró producción de BLEE. Se utilizó la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 como control positivo.

5.5 Caracterización de cepas BLEE

5.5.1 Extracción de DNA bacteriano

Los aislamientos se sembraron en agar nutritivo o en Mueller-Hinton y se incubaron a 37° C por 24 horas. En un tubo eppendorf se colocaron 100 µL de agua destilada estéril y se resuspendieron 2 o 3 colonias de la bacteria. El eppendorf se colocó en un baño a 100° C por 10 min, posteriormente se centrifugó 5 min a 14 000 rpm, y el sobrenadante se colocó en un eppendorf nuevo.

5.5.2 Amplificación del DNA bacteriano por PCR

Se utilizó una mezcla de PCR con un volumen final de 25 μ L utilizando los componentes de la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de PCR

Componente	Concentración	Volumen (μ L)
dNTP's	10 mM	0.5
MgCl ₂	50 mM	2
Buffer	1 X	2.5
Primer F	5 μ M	1
Primer R	5 μ M	1
H ₂ O		15.8
Taq DNA polimerasa	1 U	0.2
DNA bacteriano	100 ng/ μ L	2

La caracterización por PCR se realizó amplificando los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M utilizando los primers previamente descritos tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de primers

Referencia	Gen	Secuencia
L. K. Siu y col. 1999	<i>bla</i> TEM-A	5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA -3'
	<i>bla</i> TEM-B	5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3'
Coque T. M y col. 2002	<i>bla</i> SHV-F	5'-GGGTTATTCTTATTTGTCGC-3'
	<i>bla</i> SHV-R	5'-TTAGCG TTGCCAGTGCTC-3'
	<i>bla</i> CTX-M F	5'-ACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGC-3'
	<i>bla</i> CTX-M R	5'-GCCGCCGACGCTAATACATC-3'

Se utilizaron las condiciones descritas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de PCR

Ciclos	Etapas	T (°C), t
1	Desnaturalización	94, 5 min
35	Desnaturalización	94, 45 s
	Apareamiento	59, 45 s
	Extensión	72, 45 s
1	Extensión	72, 5 min

5.5.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la amplificación y el tamaño del producto se prepararon geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio. Se colocaron las muestras y se sometieron a electroforesis a 120 V durante 1 h aproximadamente, se utilizó el marcador de peso molecular HyperLadder II (Bioline, Boston M. A., E. E. U. U.). Posteriormente se visualizaron mediante luz ultravioleta en el transiluminador UVP (Biolmaging Systems, Cambridge, Inglaterra) mediante el software Labworks versión 4.5.0 2003.

5.5.4 Secuenciación de productos amplificados

Se prepararon productos amplificados de 100 µL de cada muestra a secuenciar y se purificaron con el kit de DNA Wizard PCR Prep (Promega, Madison WI, E. E. U. U.). Los productos purificados se enviaron al Instituto de Biotecnología de la UNAM. De las secuencias obtenidas, se hizo el alineamiento con el software Bioedit versión 7.0.9 2007, se analizaron con el programa BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> y comparando con las secuencias descritas www.lahey.org/Studies se hizo la identificación del tipo de BLEE.

5.6 Relación clonal de los aislamientos productores de BLEE

Para evaluar la relación clonal de los aislamientos, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados.

5.6.1 Preparación del DNA bacteriano

Los aislamientos productores de BLEE se sembraron en agar nutritivo y se incubaron por 24 horas a 37° C, posteriormente se inoculó una colonia en 5 mL de caldo BHI y se dejó incubar de 16-18 horas por 37° C. Se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó por 5 min a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de solución PIV fría, se centrifugó de nuevo por 5 min a 14 000 rpm. Se eliminó el PIV de cada tubo y se añadieron 410 µL de PIV a cada muestra y se agitó en vórtex hasta disolver.

Se añadieron 150 µL de agarosa fundida a cada tubo y se agitó en vórtex, se prepararon los bloques de agarosa en el molde. Se dejaron enfriar los bloques de agarosa a - 20°C por 5 min y se pasaron a un tubo de 15 mL. Al tubo se le añadió 1 mL de solución EC-Lisis y se llevaron al fondo los bloques. Se dejaron incubar 3 horas en baño a 37° C. Posteriormente se preparó solución ESP. Se decantó el sobrenadante de EC-lisis con una gasa estéril, y se añadió 1 mL de solución ESP y se incubó toda la noche a 50° C. Por último se lavaron los bloques con 13 mL de TE 1X por inversión durante 1 hora y se repitió 4 veces el procedimiento.

5.6.2 Restricción

Se seleccionó una parte del bloque de agarosa y se colocó en un eppendorf con 300 µL de buffer de enzima y se incubó por 30 min a 37° C. Posteriormente se eliminó el buffer de restricción y se agregó la mezcla con la enzima de restricción *Xba I* (tabla 7) y se incubó a 37° C toda la noche.

Tabla 7. Mezcla de reacción de enzima

Enzima	Concentración	Volumen (μL)
<i>Xba I</i>	15 U/ μL	1
Buffer	10 X	4
BSA	0.1 %	4
H ₂ O		41

5.6.3 Electroforesis en gel de campos pulsados

Se preparó un gel de agarosa al 1%, se introdujeron los bloques de agarosa al gel, el marcador de peso molecular y las muestras. Se cubrieron los pocillos del gel con agarosa al 1% y se programaron las siguientes condiciones: 1-60 pulsos, 23 horas. Se utilizó el equipo PFGE CHEF-DR III System (BioRad) y se corrieron con buffer TBE 0.5 X a 14° C, utilizando la bomba recirculadora ECO10 (SEV, México). Terminada la corrida el gel se tiñó con bromuro de etidio 1 μg/mL por 20 min, se enjuagó con agua destilada 2 veces por 10 min y se fotodocumentó con luz UV.

5.7 Análisis de datos

CAPÍTULO 6.

RESULTADOS

6.1 Características de los aislamientos clínicos de estudio

Se incluyeron 520 aislamientos clínicos:

89 *A. baumannii*

87 *E. cloacae*

80 *E. coli*

91 *K. pneumoniae*

90 *P. aeruginosa*

83 *S. marcescens*

Con respecto a los pacientes de los cuales se aislaron estas cepas, el 40.1% correspondieron a pacientes femeninos y 59.8% a masculinos.

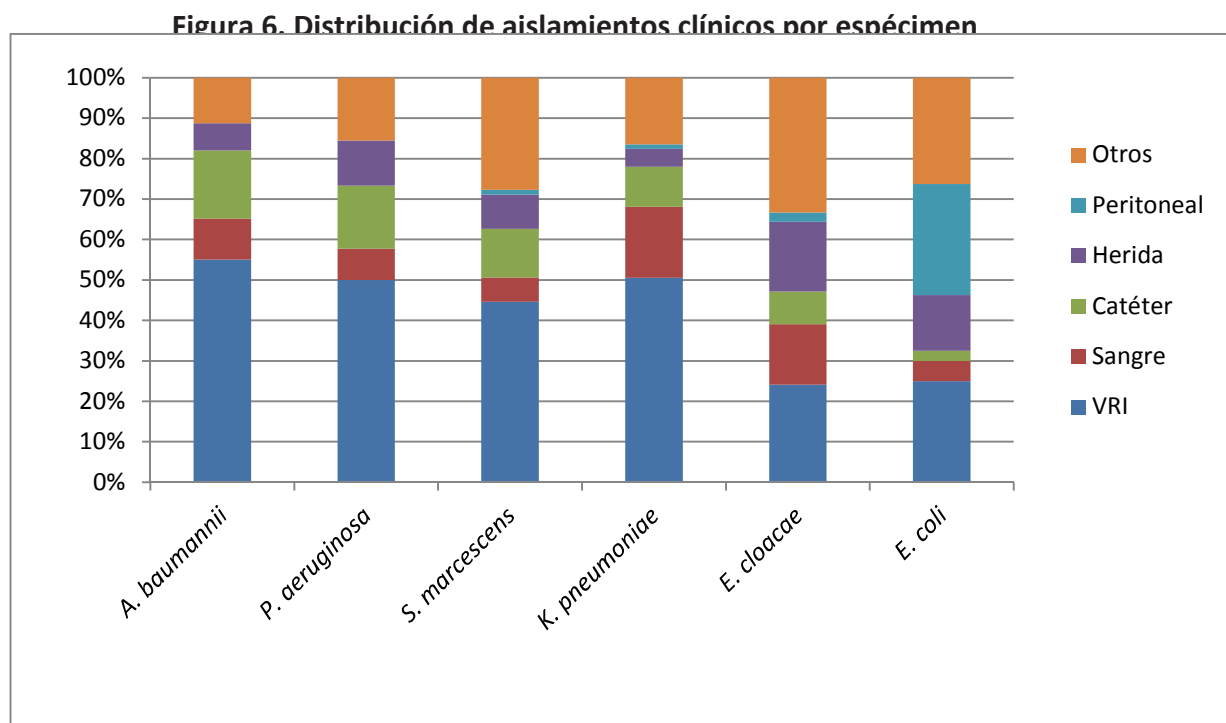
La media de edad fue de 36.12 años, la mediana 39 años y el rango fue de 0 a 93. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Características de la población estudiada

Pacientes	N = 520
Femenino (%)	40.1
Masculino (%)	59.8
Media de edad (años)	36.12
Mediana de edad (años)	39
Rango de edad (años)	0-93

En especies como *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*, la mayoría de los aislamientos provinieron de vías respiratorias como LBA, un menor porcentaje de aislamientos se recuperó de catéter y sangre. En el caso particular de *K. pneumoniae* hubo un porcentaje mayor de aislamientos de sangre y catéter. *E. cloacae* tuvo una distribución

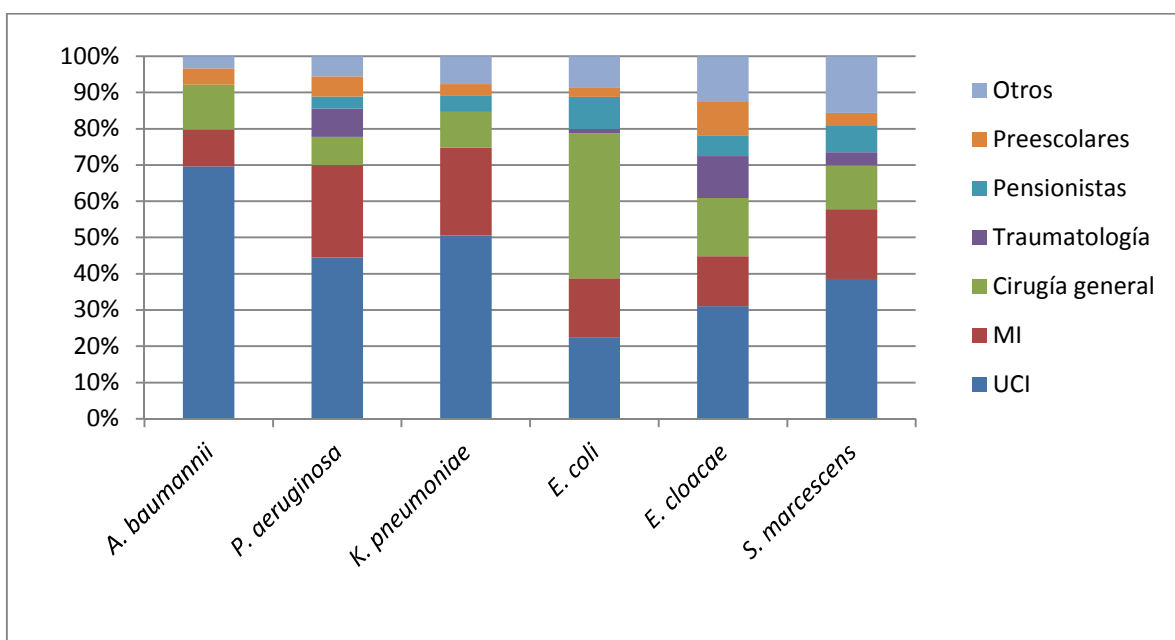
homogénea de aislamientos y los aislamientos de *E. coli* fueron en su mayoría aislados de lavado peritoneal, vías respiratorias inferiores y otros especímenes como hueso y biliar.



Para *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, más de la mitad de las cepas se aisló de salas de UCI. Con respecto a *K. pneumoniae*, casi el 30% de las cepas se aislaron de pacientes de MI y en menor porcentaje de Cirugía general.

Para *E. coli*, el mayor porcentaje de aislamientos se recuperaron en cirugía general y en menor porcentaje de UCI. La sala con mayor porcentaje de aislamientos de *S. marcescens* fue de Medicina Interna con más del 30%. Los resultados completos se muestran en la figura 7.

Figura 7. Distribución de aislamientos clínicos por procedencia



6.2 Resultados de fenotipo de resistencia

En las siguientes tablas se muestran los resultados de pruebas de sensibilidad de las especies estudiadas.

Tabla 9. Resultados de fenotipo de resistencia de *E. cloacae*

<i>E. cloacae</i>						
	Rango CMI	CMI50	CMI90	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Ampicilina	1-32	>32	>32	12	9	79
Piperacilina/ Tazobactam	1-128	4	>128	61	17	21
Ceftazidima	4-32	8	>32	52	6	42
Ceftriaxona	0.03-64	8	>64	52	8	40
Cefotaxima	2-64	64	>64	41	2	56
Cefepima	1-32	<1	>32	80	4	16

Meropenem	0.12-16	<0.12	0.25	94	2	4
Ciprofloxacina	0.5-4	<0.5	2	88	5	7
Levofloxacina	0.03-16	0.06	>8	77	3	20
Gentamicina	0.5-16	<0.5	8	88	5	7
Amikacina	0.5-64	8	<0.5	64	6	30
Tigeciclina	0.03-8	0.5	2	93	1	6

Tabla 10. Resultados de fenotipo de resistencia de *E. coli*

<i>E. coli</i>						
	Rango CMI	CMI50	CMI90	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Ampicilina	1-32	>32	>32	11	4	85
Piperacilina/ Tazobactam	1-128	4	32	85	11	4
Ceftazidima	4-32	8	>32	67	15	17
Ceftriaxona	0.03-64	8	>64	68	2	30
Cefotaxima	2-64	0.12	>64	75	2	17
Cefepima	1-32	<2	32	77	8	15
Meropenem	0.12-16	<1	<0.12	97	0	3
Ciprofloxacina	0.5-4	<0.06	>4	51	0	49
Levofloxacina	0.03-16	<0.5	16	49	3	48
Gentamicina	0.5-16	2	>16	71	7	22
Amikacina	0.5-64	<0.5	16	93	6	1
Tigeciclina	0.03-8	0.25	0.5	95	4	1

Tabla 11. Resultados de fenotipo de resistencia de *S. marcescens*

<i>S. marcescens</i>						
	Rango CMI	CMI50	CMI90	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Ampicilina	1-32	1	>32	42	16	42
Piperacilina/Tazobactam	1-128	0.5	>128	81	8	11
Ceftazidima	4-32	<8	> 32	76	0	24
Ceftriaxona	0.03-64	0.25	>64	70	11	19
Cefotaxima	2-64	64	> 64	45	0	54
Cefepima	1-32	<0.5	8	92	0	8
Meropenem	0.12-16	<0.06	0.25	97	3	0
Ciprofloxacina	0.5-4	<0.5	>4	82	0	18
Levofloxacina	0.03-16	0.12	2	89	3	8
Gentamicina	0.5-16	<0.5	>16	82	0	8
Amikacina	0.5-64	1	64	81	5	14
Tigeciclina	0.03-8	0.5	2	100	0	0

Tabla 12. Resultados de fenotipo de resistencia de *K. pneumoniae*

<i>K. pneumoniae</i>						
	Rango CMI	CMI50	CMI90	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Ampicilina	1-32	>32	>32	8	4	88
Piperacilina/Tazobactam	1-128	4	>128	62	25	11
Ceftazidima	4-32	<8	>32	61	0	39

Ceftriaxona	0.03-64	0.12	>64	59	15	26
Cefotaxima	2-64	<2	64	69	11	20
Cefepima	1-32	<1	8	90	2	8
Meropenem	0.12-16	<0.12	0.12	99	1	0
Ciprofloxacina	0.5-4	<0.5	>4	72	0	28
Levofloxacina	0.03-16	0.25	>8	68	1	31
Gentamicina	0.5-16	<0.5	>16	77	0	23
Amikacina	0.5-64	1	64	85	4	11
Tigeciclina	0.03-8	0.5	2	96	3	1

<i>A. baumannii</i>						
	Rango CMI	CMI50	CMI90	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Piperacilina/Tazobactam	1-128	>128	>128	22	0	78
Ceftazidima	4-32	>32	>32	12	0	88
Ceftriaxona	0.03-64	>64	>64	3	13	84
Cefotaxima	2-64	>64	>64	5	7	88
Cefepima	1-32	32	>32	23	21	56
Meropenem	0.12-16	4	>16	50	9	41
Ciprofloxacina	0.5-4	>4	>4	5	0	95
Levofloxacina	0.03-16	4	8	19	35	47
Gentamicina	0.5-16	4	>16	51	0	49
Amikacina	0.5-64	32	>64	37	16	47
Tigeciclina	0.03-8	0.25	0.5	99	0	1

Tabla 13. Resultados de fenotipo de resistencia de *A. baumannii*

Tabla 14. Resultados de fenotipo de resistencia de *P. aeruginosa*

<i>P. aeruginosa</i>						
	Rango CMI	CMI50	CMI90	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Piperacilina/Tazobactam	1-128	16	>128	67	0	33
Ceftazidima	4-32	<8	>32	58	8	35
Ceftriaxona	0.03-64	>64	>64	4	8	88
Cefepima	1-32	4	>32	62	15	23
Meropenem	0.12-16	1	16	73	6	21
Levofloxacina	0.03-16	1	>8	63	4	33
Amikacina	0.5-64	4	32	87	8	5

En los aislamientos probados, *E. cloacae* presentó susceptibilidad a antibióticos como cefepima y meropenem, a quinolonas y gentamicina. *E. coli* mostró alta susceptibilidad a los betalactámicos a excepción de ampicilina. *S. marcescens* fue la bacteria que mostró mayor susceptibilidad a los antimicrobianos utilizados, a excepción de ampicilina y una cefalosporina de 3era generación como cefotaxima. En los aislamientos de *K. pneumoniae* hubo alta susceptibilidad a cefepima, meropenem, ciprofloxacina, a las quinolonas y tigeciclina. *A. baumannii* se ha descrito como una de las bacterias que presentan multidrogorresistencia, es nuestros aislamientos observamos una alta resistencia solamente para tigeciclina, una resistencia intermedia a antibióticos como cefepima y levofloxacina. Y una alta resistencia a los betalactámicos. Al igual que *A. baumannii*, *P. aeruginosa* se ha descrito como una bacteria que muestra resistencia a diversos antibióticos, de los antibióticos recomendados por la CLSI, observamos en nuestros aislamientos mayor susceptibilidad en meropenem y amikacina. Y un 88% de resistencia a ceftriaxona.

6.3 Aislamientos productores de BLEE

Las especies que presentaron mayor producción de BLEE fueron *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *E. coli* con porcentajes mayores al 30% y *S. marcescens* con 20.9 %. Entre los bacilos Gram negativos no fermentadores, solo se detectó un aislamiento productor de BLEE en los aislamientos de *P. aeruginosa*.

Tabla 15. Resultados de especies productoras de BLEE

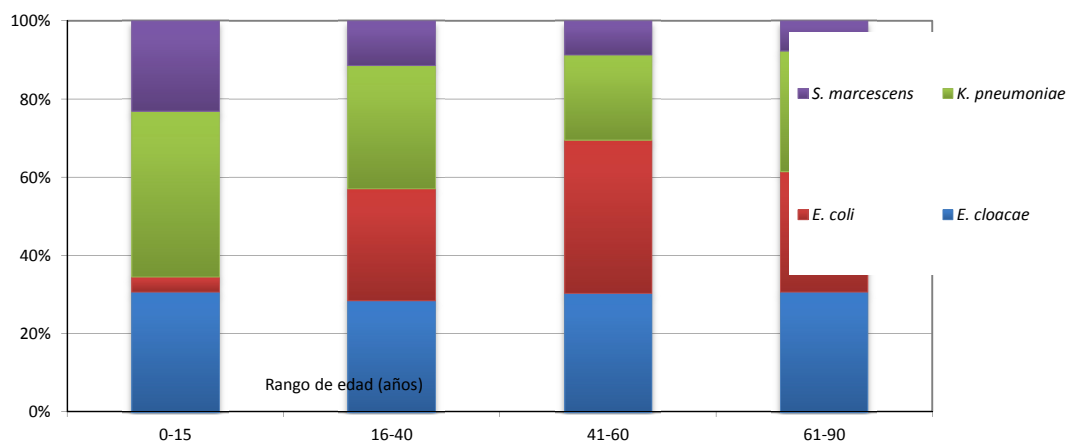
Especie	Porcentaje (%)
<i>K. pneumoniae</i>	36.9
<i>E. cloacae</i>	35.6
<i>E. coli</i>	30
<i>S. marcescens</i>	20.9
<i>P. aeruginosa</i>	1
<i>A. baumannii</i>	0

6.3.1 Características de los aislamientos productores de BLEE

6.3.2 Distribución de los aislamientos productores de BLEE por edad

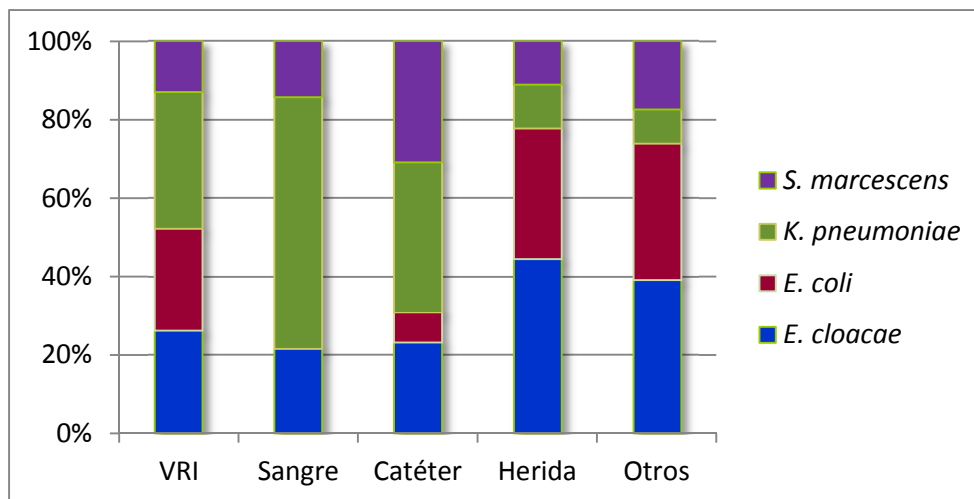
Los aislamientos de *E. cloacae* productores de BLEE se recuperaron de pacientes de todas las edades. *E. coli* se recuperó principalmente de pacientes mayores de 15 años y en contraste, en el grupo de pacientes menores de 15 años se aisló un porcentaje alto de *K. pneumoniae* al igual que *S. marcescens*.

Figura 8. Distribución de los aislamientos productores de BLEE por edad



En la distribución por espécimen clínico de las 4 especies productoras de BLEE, hay un alto porcentaje de aislamientos de *K. pneumoniae* recuperados de sangre y catéter. El mayor porcentaje de aislamientos de *E. cloacae* y *E. coli* fueron de heridas quirúrgicas.

Figura 9. Distribución de los aislamientos productores de BLEE por especímenes

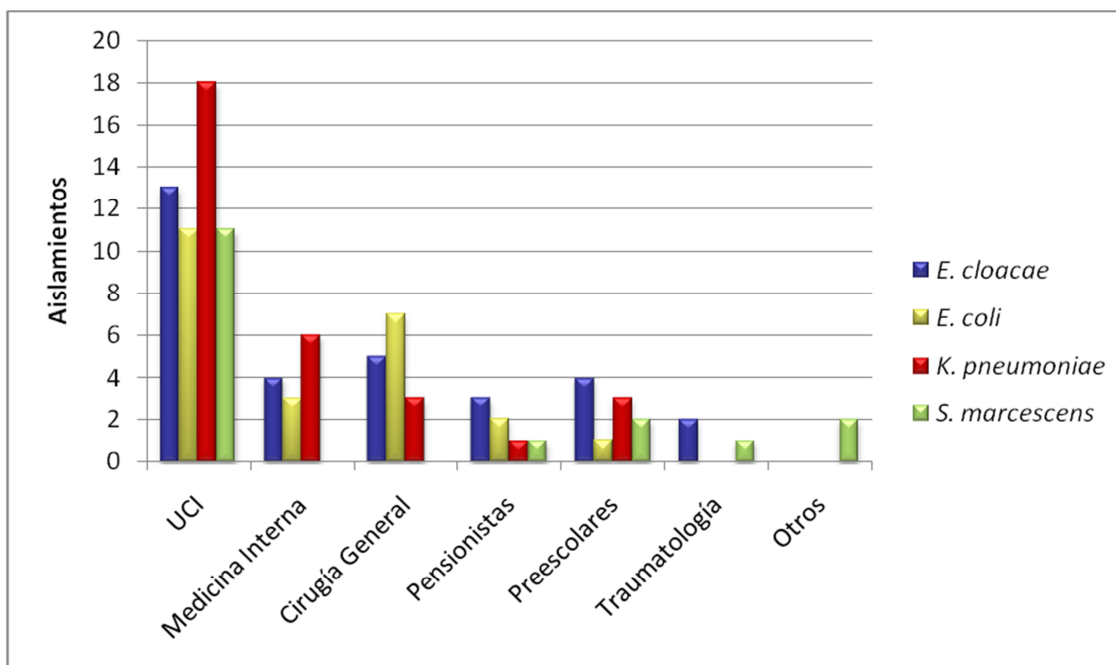


6.3.4 Distribución de los aislamientos productores de BLEE por procedencia

La mayoría de los aislamientos productores de BLEE se recuperaron de la UCI. También se aislaron de salas como MI y Cirugía general, pero en menor proporción.

En UCI la especie productora de BLEE recuperada con mayor frecuencia fue *K. pneumoniae*, al igual que en MI. EN CG, la especie aislada con mayor frecuencia fue *E. coli*.

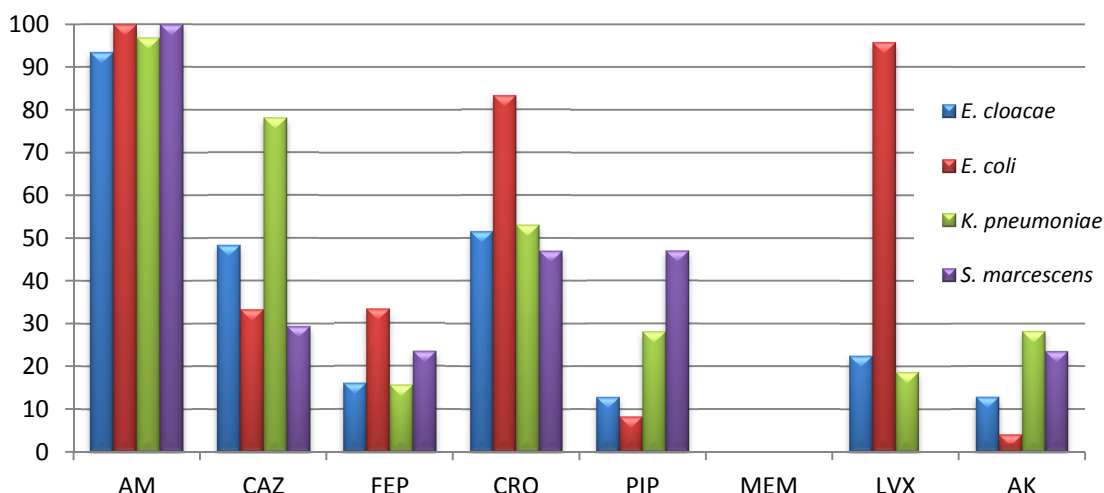
Figura 10. Distribución de los aislamientos productores de BLEE por procedencia



6.3.5 Fenotipo de resistencia de las especies productoras de BLEE

Todas las especies productoras de BLEE tuvieron más del 90% de resistencia a ampicilina. *E. cloacae* y *E. coli* presentaron alta resistencia a cefalosporinas de 3ª generación como ceftazidima y ceftriaxona, mientras que *E. coli* mostró más del 80% de resistencia a ceftriaxona y levofloxacina. Es importante señalar que aunque estas especies muestran moderada sensibilidad a las 3 cefalosporinas probadas, deben ser reportadas como resistentes a este grupo de antibióticos según el CLSI.

Figura 11. Fenotipo de resistencia de las especies productoras de BLEE



6.4 Caracterización de tipo y familia de BLEE en las cepas productoras

En más de la mitad de los aislamientos productores de BLEE de *K. pneumoniae* se detectó SHV-12, en menor porcentaje TEM-1 y en 2 aislamientos se detectó la producción tanto de TEM-1 como de CTX-M-15.

La mayoría de los aislamientos de *E. cloacae* fueron productores de TEM-1 y llama la atención que casi el 30% de los aislamientos tuvieron al menos 2 tipos de BLEE como CTX-M-15 y SHV-5, TEM-1 y CTX-M-15 y además en un aislamiento se detectaron 3 tipos TEM-1, CTX-M-15 y SHV-5.

En el 37% de los aislamientos de *E. coli* se detectaron 2 enzimas TEM-1 y CTX-M-15. En el resto de los aislamientos se detectó solo una enzima. TEM-1, CTX-M-15, SHV-2 y SHV-5.

En los aislamientos de *S. marcescens* sólo se detectaron tipos de SHV, casi la mitad fueron productores de SHV-5 y en menor porcentaje SHV-12 y SHV-2. Los resultados completos se muestran en la tabla 16.

Especie	n (%)	TEM-1	CTX-M-15	SHV-5	SHV-2	SHV-12
<i>K. pneumoniae</i>	17 (51)					+
	12 (36)	+				
	2 (6)				+	
	2 (6)	+	+			
<i>E. cloacae</i>	19 (61)	+				
	2 (6)				+	
	5 (16)		+	+		
	4 (12)	+	+			
	1 (3)	+	+	+		
<i>E.coli</i>	9 (37)	+	+			
	6 (25)	+				
	5 (20)		+			
	2 (8)			+		
	2 (8)				+	
<i>S. marcescens</i>	8 (47)				+	
	5 (29)					+
	4 (23)			+		

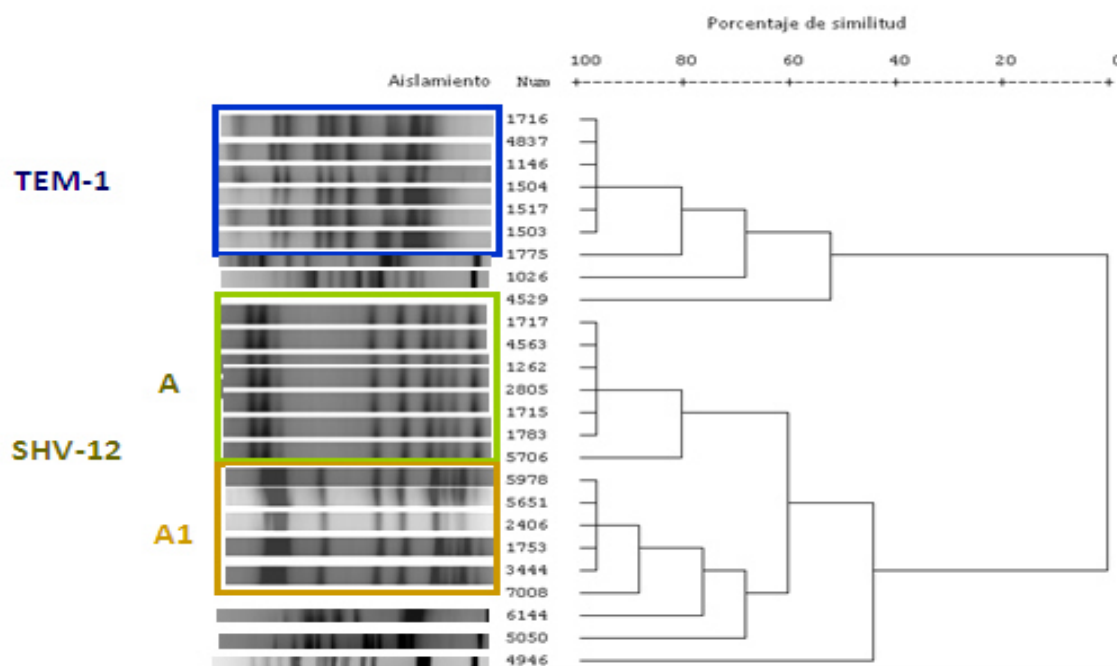
Tabla 16. Resultados del tipo de BLEE en las cepas productoras

6.5 Relación clonal de las cepas productoras de BLEE

6.5.1 Aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE

De acuerdo a los patrones obtenidos por electroforesis en campos pulsados, la mayoría de en los aislamientos de *K. pneumoniae* correspondieron a dos clonas. El patrón predominante fue denominado clona A y subtipo A1, ambos productores de SHV-12. Además se detectó una clona productora de TEM-1. El análisis completo se muestra en la figura 12. Además se analizaron las clonas A y A1 en función del tiempo.

Figura 12 .Análisis de la relación clonal de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE



La clona predominante A productora de SHV-12 mostró un comportamiento endémico, ya que se detectó de manera continua desde julio del 2006 hasta mayo del 2008- Algo similar se observó en la clona A1, ya que fue detectada de septiembre del 2006 hasta enero del 2008. Ambas clonas fueron detectadas principalmente UCI, Medicina Interna y Cirugía General. La clona productora de TEM-1 tuvo un comportamiento inicial epidémico, esto es, se detectó como brote, ya que se identificaron 5 aislamientos en un periodo de 3 meses. Esta clona se detectó una vez más casi un año después en la sala de Preescolares. Ambos análisis se muestran en los siguientes gráficos.

Figura 13. Análisis de clona A y A1 productoras de SHV-12 de *K. pneumoniae* en función del tiempo

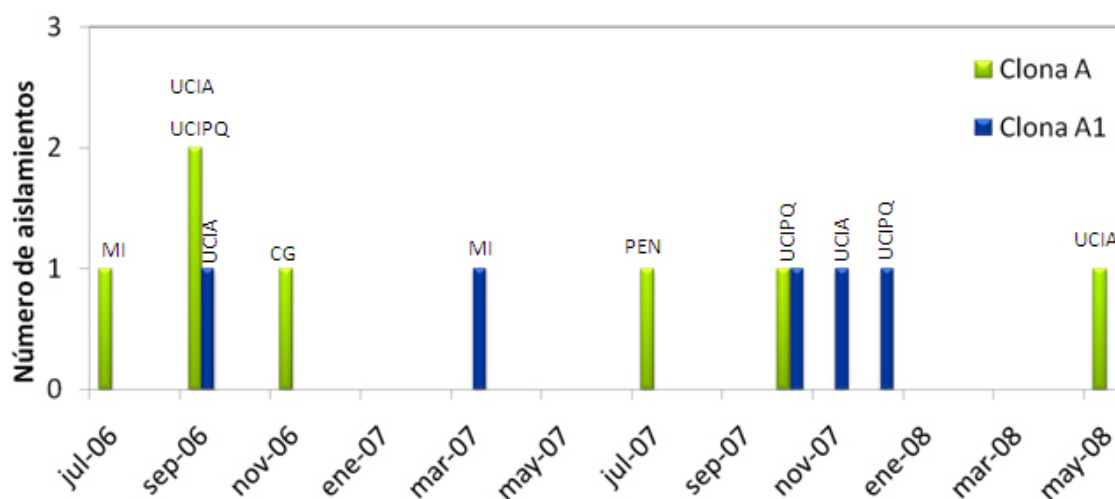
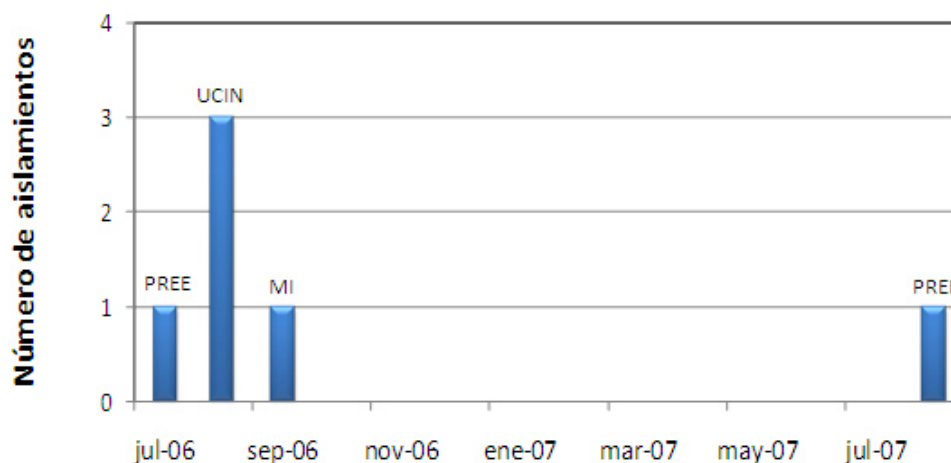


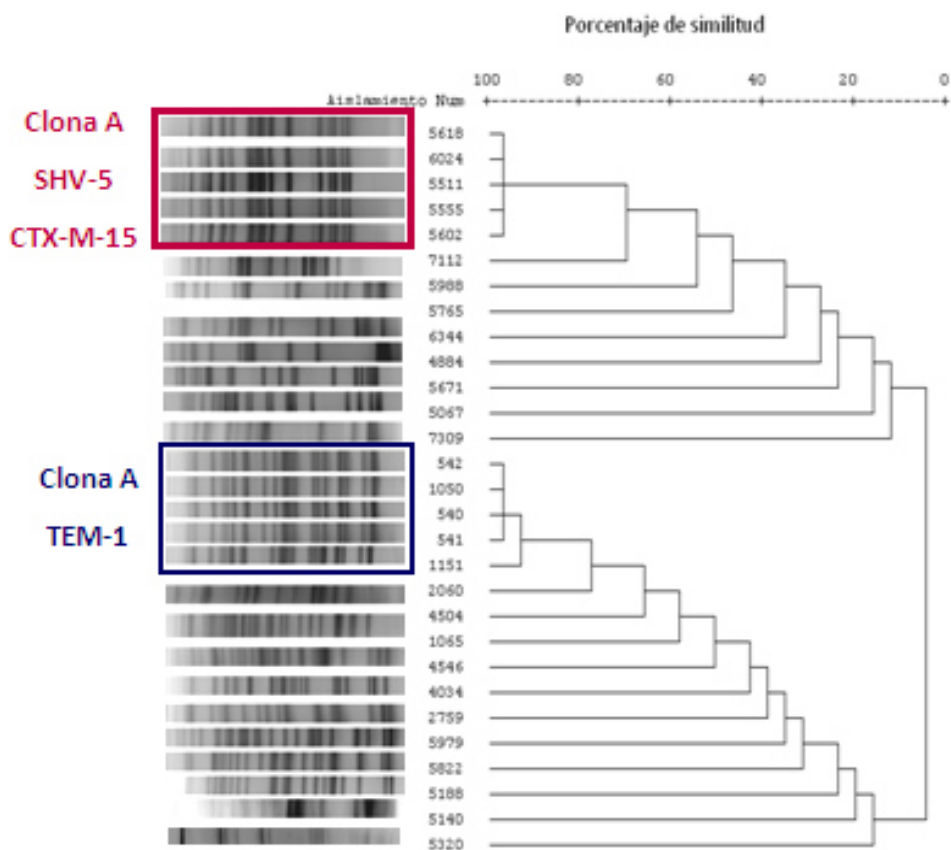
Figura 14. Análisis de clona A productora de TEM-1 de *K. pneumoniae* en función del tiempo



6.5.2 Aislamientos de *E. cloacae* productores de BLEE

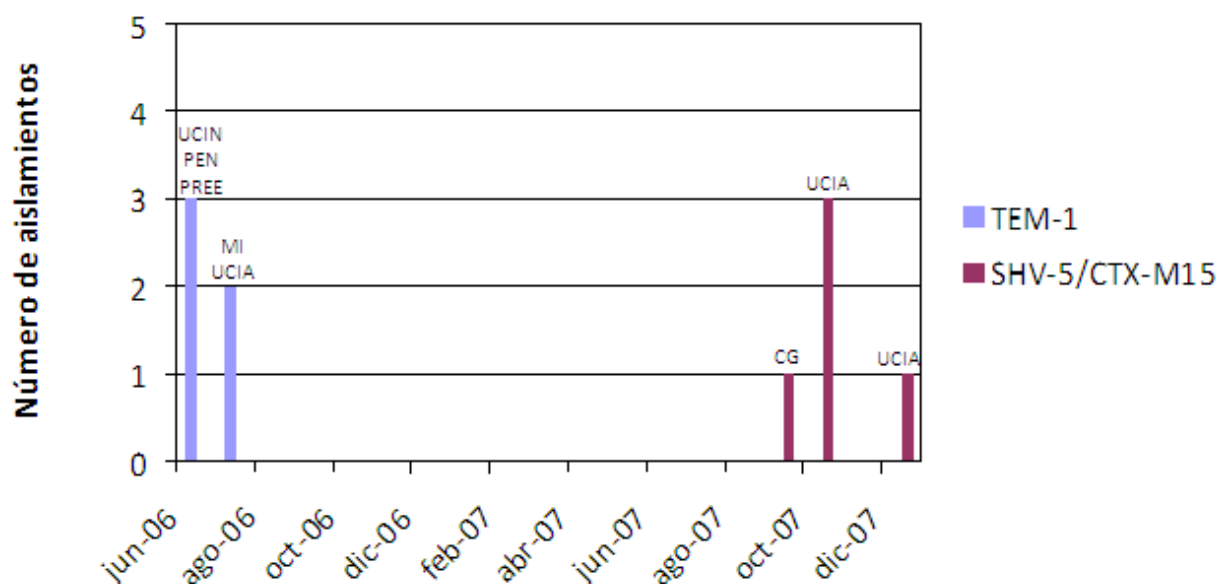
Cerca del 40% de los aislamientos de *E. cloacae* tuvieron una relación clonal. Se detectaron dos clonas una productora tanto de SHV-5 como de CTX-M-15 y otra productora de TEM-1. El resto de los aislamientos tuvieron una similitud menor al 80%.
Figura 15.

Figura 15. Análisis de la relación clonal de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE



Ambas clonas de *E. cloacae* tuvieron comportamiento epidémico. La clona productora de TEM-1 se detectó en 3 aislamientos en junio del 2006 y 2 más en agosto de ese mismo año en UCI y Medicina Interna. La clona productora de SHV-5 y CTX-M-15 tuvo un comportamiento similar, con 5 aislamientos en un periodo de 3 meses principalmente en UCIA.

Figura 16. Análisis de clonas de *E. cloacae* productoras de SHV-5/CTX-M-15 y TEM-1 en función del tiempo



6.5.3 Aislamientos de *E. coli* productores de BLEE

La mayoría de los aislamientos de *E. coli* tuvieron una baja relación clonal con un similitud menor al 60%. Sólo se detectaron dos clonas esporádicas, una productora de CTX-M-15 en julio del 2007 de UCIPQ y la otra productora de SHV-5 en junio y agosto del 2007 en UCIA y Cirugía General. Figura 17. Las características de las clonas se muestran en la tabla 17.

Figura 17. Análisis de la relación clonal de los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE

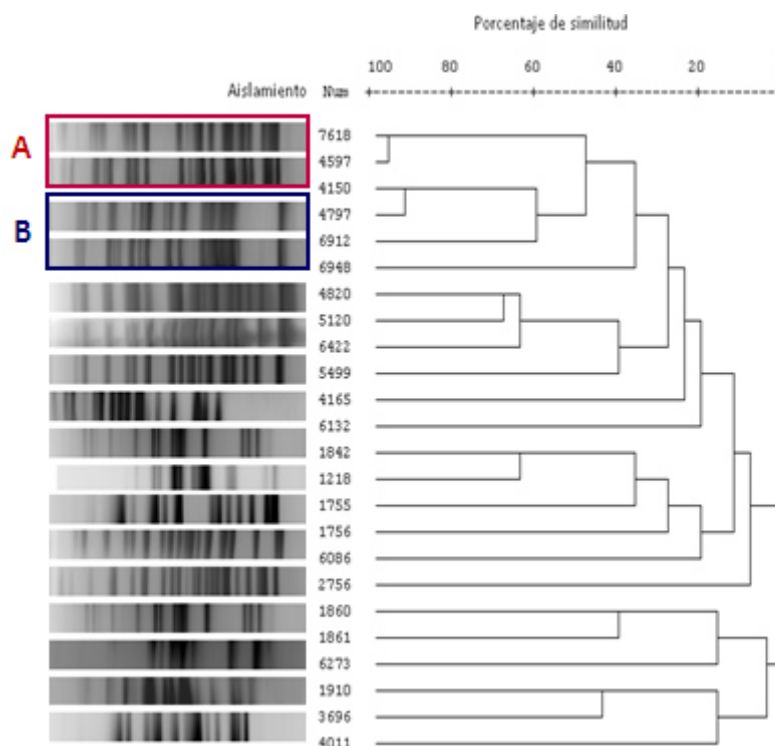


Tabla 17. Características de las clonas de *E. coli*

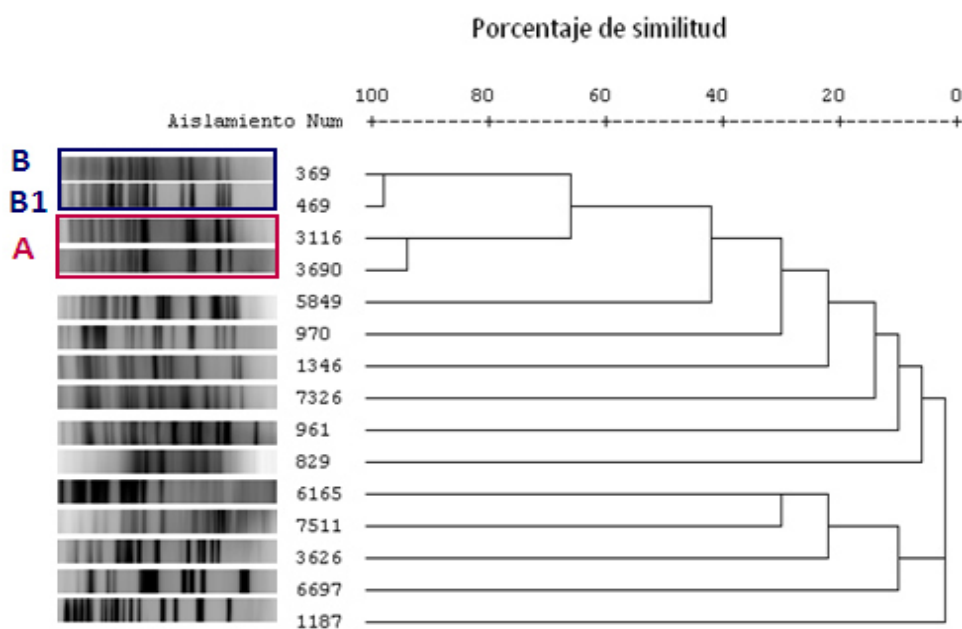
Clona	BLEE	Sala	Fecha
A	CTX-M-15	UCIPQ	jul-07
B	SHV-5	UCIA	jun-07
		Cirugía General	ago-07

6.5.4 Aislamientos de *S. marcescens* productores de BLEE

Los aislamientos de *S. marcescens* tuvieron un comportamiento similar a *E. coli*, ya que se observó una baja relación clonal entre ellos, con una similitud menor al 40%. Se detectaron dos clonas esporádicas una productora de SHV-12 en julio del 2007 de

Preescolares y Neurocirugía. Y la otra productora de SHV-2 durante enero y marzo del 2007 en UCIA, sus características se muestran en la tabla 18.

Figura 18. Análisis de la relación clonal de los aislamientos de *S. marcescens* productores de BLEE



Las características de estos aislamientos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 18. Características de las clonas de *S. marcescens*

Clona	BLEE	Sala	Fecha
A	SHV-12	Preescolares	jul-07
		Neurocirugía	jul-07
B	SHV-2	UCIA	ene-07
B1	SHV-2	UCIA	mar-07

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

Los antibióticos betalactámicos son los más utilizados en la práctica clínica. En este estudio se evaluó el perfil de resistencia a varios grupos de antibióticos de 520 aislamientos clínicos de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens* obtenidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” durante el periodo enero 2006-junio 2009. Todas las especies mostraron alta resistencia de al menos 40% a ampicilina. Estos resultados son mayores a los reportados por Benavides-Plascencia en el 2005, en este estudio se aislaron especies de BLEE de 6 hospitales de tercer nivel de la ciudad de México y obtuvieron el mayor porcentaje de resistencia (33%) para *E. coli*. En contraste con lo publicado por Hernández en el 2007, en el que determinaron los porcentajes de resistencia en aislamientos nosocomiales del Hospital Civil de Guadalajara al menos el 88% de resistencia frente a aislamientos de *E. coli*.

La mayoría de las especies estudiadas presentaron una resistencia moderada frente a los antibióticos probados y sólo se observó una resistencia mayor a ceftazidima, cefepima, piperacilina/tazobactam, meropenem, levofloxacina y amikacina, en aislamientos de *A. baumannii* (88, 56, 78, 41, 47 y 47% respectivamente).

La producción de enzimas BLEE en bacilos Gram negativos se ha descrito como el principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos. Las especies más productoras de BLEE son *K. pneumoniae* y en menor frecuencia *E. coli*. Sin embargo, no son únicas ya que se han descrito en otras especies en menor frecuencia como *S. marcescens* y *E. cloacae* entre otras (De Champs, 2000).

La frecuencia de BLEE es variable en función de las regiones, el tiempo de estudio y la presencia de brotes. En Estados Unidos, la frecuencia de producción de BLEE varía de 0-25% dependiendo de la institución, con un promedio de alrededor del 3% (Winokur, 2001).

En los países europeos, la prevalencia de BLEE es variable, En Reino Unido, se estudiaron aislamientos de 11 hospitales y se observó que menos 1% de los de *E. coli* y *K. pneumoniae* son productores de BLEE, contrario a lo reportado en Francia donde el 20% de los aislamientos de *K. pneumoniae* son productores de BLEE (Winokur, 2001).

En Japón la prevalencia de BLEE ha permanecido baja. En un estudio que incluyó 196 instituciones se reportó menos del 0.1% de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE y sólo 0.3% de aislamientos de *K. pneumoniae* (Lewis, 1999). En América Latina se reportó un 27% de prevalencia de BLEE y menor porcentaje en Argentina (7%), Costa Rica (7%) y Uruguay (7%). De los 520 aislamientos estudiados, las especies productoras de BLEE fueron las Enterobacterias como *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* y *S. marcescens* con porcentajes superiores al 20%. El mayor porcentaje de aislamientos productores de BLEE fue de 36.9% correspondiente a *K. pneumoniae*, esto concuerda con lo reportado a nivel mundial, sin embargo, es menor a lo reportado por Miranda y col. en el 2004, donde se detectó un 50% de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE.

A pesar de que los aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* mostraron alta resistencia a la mayoría de los antibióticos probados, sólo 1 aislamiento de *P. aeruginosa* y ninguno de *A. baumannii* fueron productores de BLEE, por lo que se sugiere la producción de BLEE diferentes a TEM, SHV y CTX-M, además de la existencia de otros mecanismos de resistencia diferentes a la producción de enzimas BLEE, como alteración en la permeabilidad de la membrana, modificación de las dianas y expresión de bombas de eflujo (Jiang, 2006).

En Europa, la BLEE identificada con mayor frecuencia es el tipo SHV-5 mientras que en Estados Unidos TEM-10 y TEM-12 son las más prevalentes. En América Latina existe escasa información de prevalencia de BLEE, pero estudios principalmente de Argentina,

Venezuela, Brasil y México reportan SHV-5 y CTX-M-2 como las más prevalentes (Alpuche 2002). En México, Silva y col. han realizado varios reportes en los que han descrito aislamientos productores de BLEE de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter spp* de tipo SHV particularmente SHV-5 y adicionalmente describieron una nueva BLEE denominada TLA-1 (Silva J. y col. 2000) encontrada en México. De estos reportes destacan el brote producido por *K. pneumoniae* productora de SHV-5 en un hospital de Morelos, México que incluyó 21 niños menores de 2 meses durante un periodo de 4 meses (junio-octubre 1996), la tasa de mortalidad fue del 62%. Garza-Ramos y col. en 2007 describieron 14 aislamientos de especies de Enterobacterias como *Klebsiella spp.*, *E. coli* y *E. cloacae* productoras de SHV-1, SHV-2 y SHV-5. También se describió un brote causado por 20 aislamientos de *S. marcescens* productores de SHV-5 en un hospital de la ciudad de México durante agosto de 1999 (Espinosa de los Monteros, 2008), y recientemente en noviembre del 2009, se hizo el reporte de un aislamiento de *E. coli* productor de CTX-M-15 (Rocha-Gracia, 2009).

En este trabajo se detectaron los tipos SHV-12, CTX-M-15 y TEM-1 en *K pneumoniae*, los cuales no se habían reportado en México. En nuestro país, solamente se habían reportado los tipos TEM-1 y SHV-5 en *K. pneumoniae*, siendo este último el reportado con mayor frecuencia en esta especie (Silva 2006).

En México, solamente se había reportado en *E. cloacae* la producción de SHV-5. En este trabajo se detectaron además aislamientos de *E. cloacae* productores de SHV-2 y CTX-M-15.

En *E. coli*, se ha reportado en México la presencia de aislamientos productores de SHV-5 y CTX-M-15. En nuestro trabajo, además de estos dos tipos, se detectó *E. coli* SHV-2. Para *S. marcescens*, sólo se ha descrito en México la presencia de aislamientos productores de SHV-5. En esta investigación se detectaron además aislamientos productores de SHV-2 y SHV-12.

El desarrollo de las técnicas de tipificación clonal ha permitido detectar el origen y la ruta de epidemias hospitalarias, así como definir estrategias de control y eliminación de la infección. La técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) ha permitido establecer categorías de relación genética entre las especies. Al hacer el análisis de las especies incluidas en este estudio según los patrones de PFGE, en los aislamientos de *K. pneumoniae*, hubo 2 patrones predominantes denominados clona A y subtipo A1 (ambos productoras de SHV-12), detectados desde julio del 2006 hasta mayo del 2008 en UCI, Medicina Interna y Cirugía general. También se detectó una clona productora de TEM-1. Este es el primer reporte de una clona de *K. pneumoniae* productora de SHV-12 en México. Este tipo de BLEE había sido descrito previamente en Malasia (Palasubramaniam, 2009), Arabia Saudita (Al-Obeid, 2008) y recientemente en Indonesia (Severin, 2010).

La clona de *K. pneumoniae* productora de TEM-1 tuvo un comportamiento inicial epidémico, se identificaron 5 aislamientos en un periodo de 3 meses y casi un año después en la sala de Preescolares, sin embargo se sugiere la presencia de otro tipo de BLEE diferente a TEM, SHV o CTX-M, ya que TEM-1 no tiene comportamiento de espectro extendido.

En los aislamientos de *E. cloacae* se detectaron dos clonas una productora tanto de SHV-5 como de CTX-M-15 con un comportamiento epidémico se obtuvieron 5 aislamientos en un periodo de 3 meses principalmente en UCIA.

En México se han reportado brotes por *E. cloacae* productora solamente de SHV-5 (Garza-Ramos, 2009), pero no hay reportes de *E. cloacae* productor de CTX-M-15.

Entre los aislamientos productores de BLEE de *S. marcescens* y *E. coli* no se observó relación clonal, sólo se encontraron clonas esporádicas.

Los resultados de este trabajo serán de utilidad para el control de las infecciones causadas por estas especies bacterianas, ya que permitieron conocer que:

- 1) Los aislamientos de *E. coli* y *S. marcescens* productores de BLEE no tienen relación de clonas, por lo que se deben realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos.
- 1) Existen dos clonas de *K. pneumoniae* productoras de SHV-12, con un patrón de resistencia conocido y alta transmisibilidad, lo cual permitirá: desarrollar terapias empíricas específicas contra los aislamientos de estas especies y limitar el uso de los antibióticos a los cuales estas clonas son resistentes

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

- *K. pneumoniae* y *E. cloacae* fueron las especies con mayor frecuencia de producción de BLEE.
- Todos los tipos de BLEE detectados en este trabajo, ya habían sido reportados previamente a nivel mundial.
- Este es el primer reporte en México de:
 - *K. pneumoniae* productora de SHV-12 y TEM-1/CTX-M-15.
 - *E. cloacae* productora de SHV-2, TEM-1/CTX-M-15.
 - *E. coli* productora de SHV-2.
 - *S. marcescens* productora de SHV-2 y SHV-12.
- Las especies con más aislamientos relacionados genéticamente fueron *K. pneumoniae* y *E. cloacae*.
 - 2 clonas endémicas de *K. pneumoniae*: SHV-12 y TEM-1.
 - 2 clonas epidémicas de *E. cloacae*: TEM-1 y SHV-5/CTX-M-15
 - La mayoría de los aislamientos productores de BLEE de *E. coli* y *S. marcescens* no tuvieron relación genética.
 - 2 clonas esporádicas de *E. coli*: CTX-M-15 y SHV-5.
 - 2 clonas esporádicas de *S. marcescens*: SHV-2 y SHV-12.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

- Al-Obeid S, Bremont S, Jabri L, Massoudi N, Haddad Q. *Klebsiella pneumoniae* LO10 producing extended-spectrum beta-lactamase SHV-12 in Saudi Arabia. J Chemother. 2008;20: 709-713
- Alpuche Aranda C., Daza Timaná C. Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos. Enf. Infec. y Micro 2002; 22(4): 192-199
- Ambler R.P. The structure of betalactamase. Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci. 1980;289: 321-331
- Bradford P. A. Extended-Spectrum betalactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol. Rev. 2001;14: 933-951
- Brooks G., Butel J., Morse S., Microbiología Médica de Jawetz, 18a edición, 2005, 243-256 ISBN 970-729-136-2. Editorial El Manual Moderno
- Bush, K., Jacoby G.A., Medeiros, A. A. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 1995;39: 1211–1233
- Coque T. M., Oliver A., Pérez-Díaz J. C., Baquero F., Cantón R. Genes Encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 Extended-spectrum betalactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 500-510
- Cruz García E., Miranda Novales M.G. Perdiendo la batalla: resistencia antimicrobiana en Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y estrategias de control. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2005; 25

- Datta, N., and P. Kontomichalou. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 1965;208: 239–241
- De Champs C., Sirot D., Chanal C., Bonnet R., Sirot J. A 1998 survey of extended-spectrum Betalactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44: 3177-3179
- E. P. Abraham, E. Chain an enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940;146: 837-837
- Eliecer Canoa M., Domínguez M.A., Ezpeletac C., Padillad B., Ramírez E., Martínez-Martínez L. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2008;26: 220-9
- Espinosa de los Monteros LE, Silva-Sanchez J, Jiménez LV, Rojas T, Garza-Ramos U, Valverde V. Outbreak of infection by extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Serratia marcescens* in a Mexican hospital. *J Chemother.* 2008;20: 586-592
- Garza-Ramos U, Davila G, Gonzalez V, Alpuche-Aranda C, López-Collada VR, Alcantar-Curiel D, Newton O, Silva-Sanchez J. The blaSHV-5 gene is encoded in a compound transposon duplicated in tandem in *Enterobacter cloacae*. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15: 878-80
- Garza-Ramos U, Martínez-Romero E, Silva-Sánchez J. Betalactamasas de espectro extendido tipo SHV están codificadas en plásmidos relacionados en aislamientos clínicos de Enterobacterias en México. *Salud Publica Mex* 2007;49: 415-421
- Gudiol F., Marín M. Antibióticos betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2003;21: 42-55
- Huletsky A., Knox J. R., Levesque R. C. Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2 betalactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34: 1725-1732

- Kliebe C., Nies B. A., Meyers J. F. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 28: 302-307
- Knothe H., Shah P., Kreméry V. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime en clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11: 315-317
- Lewis M., Yamaguchi K., Biedenbach D. *In vitro* evaluation of cefepima and other broad-spectrum Betalactamases in 22 medical centers in Japan: a phase II trial comparing two annual organism samples. The Japan Antimicrobial Resistance Study Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999;35: 307-315
- L. K. Siu, Po-Liang Lu, Po-Ren Hsueh, F. M. Lin, Shan-Chwen Chang, Kwen-Tay Luh, Monto Ho, Chin-Yun Lee. Bacteremia due to extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37: 4020–4027
- Livermore, D. Betalactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Review* 1995;8: 557-584
- Livermore, D. betalactamases mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother* 1998;41: 25-41
- Mar Marín, Francesc Gudiol. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21: 42-55
- Miranda G, Castro N, Leaños B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, Solórzano F, Chihu L, Silva J. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42: 30-35
- Palasubramaniam S, Muniandy S, Navaratnam P. Resistance to extended-spectrum beta-lactams by the emergence of SHV-12 and the loss of OmpK35 in *Klebsiella*

- pneumoniae* and *Escherichia coli* in Malaysia. J Microbiol Immunol Infect. 2009;42: 129-133
- Pere C., Coque M. T., Domínguez M. A., Vázquez J., Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. S.E.I.M.C 2005
- Philippon A., Labia R., Jacoby G. Extended-spectrum betalactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 1989;33: 1131-1136
- Pitout J. D., Laupland K. B. Extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. Lancet Infect. Dis. 2008; 8: 159-166
- Rocha-Gracia R., Ruiz E., Romero-Romero S., Lozano-Zarain P, Somalo S., Palacios-Hernández J.M., Caballero-Torres P., Torres C. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant qepA1 in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. J. Antimicrob. Chemother. 2009
- Samaha-Kfuory, J.N., Araj G.F. Recent developments in betalactamases and extended spectrum betalactamases. B.M.J. 2003; 327: 1209-1213
- Severin JA, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Lestari ES, Purwanta M, Lemmens-Den Toom N, Duerink DO, Hadi U, van Belkum A, Verbrugh HA, Goessens WH. Molecular characterization of extended-spectrum Betalactamases in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Surabaya, Indonesia. J Antimicrob Chemother. 2010
- Silva J., Aguilar C. Ayala G. Estrada M. A., Garza-Ramos U., Lara-Lemus R., Ledezma L. TLA-1: a New Plasmid-Mediated Extended-Spectrum b-Lactamase from *Escherichia col*. Antimicrob. Agents Chemother. 2000;44: 997-1003
- Silva-Sánchez J., Garza-Ramos U., Sánchez A., Rojas T., Reyna F., Carrillo B. β -lactamasas en Enterobacterias como principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos. Rev. Latinoam. Microbiol. 2006; 48: 105-112

- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. ,Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995 September; 33: 2233–2239
- Winokur P., Canton R., Casellas J. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum Betalactamases phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region, 2001; 32: 94-103
- Xiaofei Jiang, Zhe Zhang, Min Li, Danqiu Zhou, Feiyi Ruan, and Yuan Lu. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50: 2990–2995
- Zemelman R., Valenzuela L., Domínguez M., Bellot H., González G., Zemelman C. Detección de β -lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de microbiología. Rev. Chil. Infect. 2002; 19: 92-95

CAPÍTULO 10

APÉNDICES

Apéndice A

Preparación de reactivos y soluciones

Bromuro de etidio 0.5 mg/ mL (solución stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura y aforar a 50 mL.

Bromuro de etidio 2 µg/ mL

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock más 249 mL de agua ultrapura).

EC

Disolver 29.2 g de NaCl, 1 g de deoxicolato de sodio, 2.5 g de laurilsarcosina de sodio, 2.5 g de brij 58, 5 mL de Tris 1 M pH 8.0 y 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0. Ajustar con agua a 500 mL y esterilizar

EC-lisis

Disolver 15 mL de EC y 75 µL de RNAsa 10 mg/mL.

EDTA 500 mM pH 8.0 (ácido etilen diamino tetracético).

Disolver 9.306 g de Na₂EDTA·2H₂O en 40 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL.

ES

Pesar 93.1 g de EDTA y disolver en 400 mL de agua destilada, ajustar pH a 9 con \approx 20 g de NaOH, añadir 0.5 g de sarcosyl. Ajustar con agua hasta 500 mL y esterilizar.

ESP

Disolver 15 mg de proteinasa K en 15 mL de ES

Etanol al 70%

Mezclar 70 mL de etanol al 100% más 30 mL de H₂O destilada esteril.

Fenol saturado

- a) Se funde el fenol a 68 °C en Tris- HCl 0.5 M para evitar su cristalización, debe ser equilibrado a un pH mayor de 8. Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% (función antioxidante)
- b) Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5M pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 (medir con papel indicador).
- c) Agitar durante 24 horas en cuarto frío, dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o embudo de separación. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1M pH 8.0
- d) Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1M pH 8.0 conteniendo β -mercaptoetanol a una concentración 0.2%.
- e) La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20 °C, las alícuotas de fenol en uso se almacenan a 4° C.

Gel de agarosa al 1.5%

Disolver 1.5 g de agarosa en 100 mL de TBE 1X, calentar en microondas o en una plancha de calentamiento hasta que esté fundido, agregar 10 µL de bromuro de etidio 2mg/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

Jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 mL de glicerol en TE 1X pH 8.0 aforar a 10 mL.

Proteinasa K 10 mg / mL

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5

PIV

Disolver 29.22 g de NaCl en 5 mL de Tris 1 M pH 8.0. Ajustar a 500 mL y esterilizar.

SEVAG (24:1)

Disolver 24 mL de cloroformo más 1 mL de alcohol isoamílico.

TBE 10 X Solución stock

Disolver 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico en 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y en agua ultrapura aforar a 500 mL.

TBE 0.5 X Solución de trabajo

Disolver 50 mL de TBE 10X y aforar a 1 L.

TE 1X

Mezclar 500 μ L de Tris- HCl 500 mM pH 8.0 y 50 μ L de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25 mL.

Tris-HCl 500 mM pH 8 (Solución stock)

Disolver 30.3 g de trizma base en 300 mL de agua ultrapura, ajustar el pH con ácido clorhídrico concentrado y aforar a 500 mL.